



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME KARSİNOMLARINDA SOX2 EKSPRESYONUNUN
PATOLOJİK VE KLİNİK PARAMETRELERLE
KARŞILAŞTIRILMASI: İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER ÇALIŞMA**

DR. ZEYNEP RUKEN ŞAMAN

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SUZAN ZORLUDEMİR**

ADANA- 2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında bilgi, beceri ve deneyimleriyle beni aydınlatan, sabırla dinleyen ve verdiği destekle her zaman bana güç veren, değerli tez danışmanım Prof. Dr. Suzan Zorludemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Gülfiliz Gönülüşen, Prof. Dr. Figen Doran, Prof. Dr. Melek Ergin, Prof. Dr. Derya Gümürdülü, Prof. Dr. Aysun Uğuz, Prof. Dr. Şeyda Erdoğan, Yard. Doç. Dr. Arbil Açıkalın ve Yard. Doç. Dr. Emine Kılıç Bağır'a uzmanlık serüvenimde mesleki bilgi ve tecrübelerini paylaşarak gelişimime katkı sağladıkları için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın klinik bölümünde hasta verilerine ulaşmamı sağlayan Prof. Dr. Semra Paydaş'a, istatistiksel değerlendirmedeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na teşekkür ederim.

Çalışmamın RT-PCR aşamasında özverili çalışmaları nedeniyle Uzm. Biyolog. Demet Aras'a, immünohistokimyasal aşamada teknisyen Kezban Bostaner ve Gülafer Korkut'a, kesit alma aşamasında Sinan Özbulat ve Elif Şan'a teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar ekibimize ve bölümümüzde görevli tüm bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, tez yazım sürecimde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Sevil Karabağ, Goncagül Ayhan ve Nazlı Soygun başta olmak üzere halen çalışmakta olduğum ve uzmanlık eğitimini tamamlamış tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı TTU20142719 nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, bana güç veren, sevgisini ve ilgisini her zaman yanıbaşımnda hissettiğim yol arkadaşım Serhan Hakkoymaz'a ve destekleriyle beni mutlu eden Hakkoymaz ailesine çok teşekkür ediyorum.

Hayatımın her anında yanımda olan, tüm kararlarımda beni destekleyen, eğitimim süresince de ilgi ve anlayışlarını eksik etmeyen, verdikleri manevi güçle zorlukları aşmamı sağlayan anneme, babama ve kardeşlerime şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ:.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Karsinomu Genel Bilgiler	2
2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji:	2
2.1.2. Etiyoloji	3
2.1.3. Meme Kanserlerinde Görüntüleme	5
2.1.4. Lokalizasyon.....	6
2.1.5. Klinik Özellikler	6
2.1.6. Meme Karsinogenezi Ve Tümör Progresyonu	6
2.2. İnvaziv Meme Karsinomları	8
2.2.1. İnvaziv Meme Karsinomlarında Prognostik Faktörler	10
2.2.2. Meme Karsinomu Tedavisi:	18
2.2.3. Moleküler Sınıflama ve Prognostik Önemi:	19
2.3. SOX2'nin Moleküler Mekanizmalarla Onkolojik Potansiyeli:	21
2.4. SOX2'nin Meme Karsinogenezindeki Rolü:	25
2.5. Polimeraz chain reaksiyon (PCR) Tekniğinin Temel Prensipleri	28
2.5.1. PCR'da Temel Aşamalar:	30
2.5.1.1. Denatürasyon:	30
2.5.1.2. Bağlanma (Annealing):.....	30
2.5.1.3. Uzama (Extension):	30
2.5.2. Real Time PCR (RT-PCR)	31

2.5.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Real-Time PCR’da Tespiti	33
2.5.4. Real Time PCR’ın Temel Fazları	33
2.5.5. Real Time PCR’da Kantitatif Analiz	34
2.5.5.1. Standart Kurve Metodu:	34
2.5.5.2. Orantılı CT Değeri Metodu:	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1. Olgu Seçimi:	36
3.2. Etik Kurul	36
3.3. Yöntem	36
3.3.1. RT-PCR Yöntemi	36
3.3.1.1. Deparafinizasyon	37
3.3.1.2. RNA İzolasyon Basamakları	37
3.3.1.3. c DNA Sentez Aşaması:	38
3.3.1.4. RT-PCR Aşaması	38
3.3.2. Manuel İmmünohistokimya Çalışma Yöntemi	38
3.3.2.1. Dokuların Hazırlanması	38
3.3.2.2. Boyanma Aşamaları	39
3.3.2.3 İmmünohistokimya Skorlama Metodu	39
3.3.3. İstatiksel Analiz:	39
4. BULGULAR	41
4.1. Olguların Demografik Dağılımı:	41
4.2. İmmünohistokimyasal ve RT-PCR ile elde edilen SOX2 Ekspresyonunun Klinikopatolojik Parametrelerle Karşılaştırılması:	44
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR:	58
ÖZGEÇMİŞ:	72
EKLER	73
Ek-1. Resimler	73

TABLO LİSTESİ

Tablo no:

Sayfa no:

Tablo 1. Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki Sinyal Yolakları.....	8
Tablo 2. AJCC, klinik evreleme.....	9
Tablo 3. AJCC, TNM evreleme sistemi.....	9
Tablo 4. AJCC, TNM sınıflamasında metastaz (M) durumu.....	10
Tablo 5. AJCC, TNM sınıflamasında lenf nodu (N) durumu	11
Tablo 6. AJCC, TNM sınıflamasında lenf nodu (N) durumu	12
Tablo 7. AJCC, TNM sınıflamasına göre tümör çapı (T) evrelemesi.....	13
Tablo 8. Meme Tümörleri Klasifikasyonu (WHO 2012).....	14
Tablo 9. Modifiye Bloom-Richardson sistemi Nottingham derecelendirme sistemi	16
Tablo 10. FDA HER2/neu skora sistemi.....	17
Tablo 11: Verilerin demografik dağılım tablosu.....	42
Tablo 12: SOX2 (+) liği ile olguların yaşının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	44
Tablo 13: SOX2 (+) liği ile olguların tümör çapının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	44
Tablo 14: SOX2 (+) liği ile olguların tümör çapının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	44
Tablo 15: SOX2 (+) liği ile olguların gradelerinin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	45
Tablo 16: SOX2 (+) liği ile subtiplerin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	45
Tablo 17: SOX2 skorları ile pT'nin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları.....	46
Tablo 18: SOX2 (+) liği ile lenfovasküler invazyonun dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	46
Tablo 19: SOX2 (+) liği ile lenf nodu metastazının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	46
Tablo 20: SOX2 (+) liği ile uzak metastazın dağılım ve karşılaştırılma sonuçları	47
Tablo 21:SOX2 (+) liği ile olguların evrelerinin karşılaştırılması	47
Tablo 22: SOX2 (+)liği ile hormon reseptör durumu ve ki 67 indekslerinin karşılaştırılması ...	48
Tablo 23: SOX2 saptanmasında kullanılan RT-PCR ve İmmünohistokimya yöntemlerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 24: SOX2 ile olguların durumlarının karşılaştırılması.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil no:

Sayfa no:

Şekil 1. SOX ailesi şematik görünümü	24
Şekil 2. SOX2'nin rol aldığı basamaklar.	24
Şekil 3. SOX2'nin hücre yaşamındaki etkileri ve görev aldığı yollar.....	28
Şekil 4. PCR'da temel aşamalar.	31
Şekil 5: Real Time PCR'da cevap eğrisi.	34
Şekil 6. SOX2 varlığının genel sağ kalım üzerine etkisi.....	49
Şekil 7: SOX2 varlığının hastalısız sağkalım üzerine etkisi	50
Şekil 8. RT-PCR ile β aktin (Referans gen) Amplifikasyon Eğrileri.	50
Şekil 9. RT-PCR ile SOX2 Gen ekspresyonunun Amplifikasyon Eğrileri.....	51
Şekil 10. RT-PCR ile β aktin geninin 9:1 orandaki PAGE yürütülmesi	51
Şekil 11. RT-PCR ile SOX2 gen ekspresyonu 9:1 orandaki PAGE yürütülmesi	51

KISALTMALAR

ADH	: Atipik Duktal Hiperplazi
AJCC	: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (Joint Cancer Committee)
ALH	: Atipik Lobüler Hiperplazi
Bp	: Baz çifti
ChIP	: Chromatin Immunoprecipitation (kromatin İmmün Presipitasyon)
CK	: Sitokeratin
CSC	: Kanser kök hücreleri (Cancer stem cells)
CT	: threshold cycle=eşik döngü değeri
dATP	: deoksiadenozintrifosfat
DCIS	: Duktal Karsinoma in situ
dCTP	: deoksisitozintrifosfat
dGTP	: deoksiguanozintrifosfat
dTTP	: deoksitimidintrifosfat
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor - Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Östrojen reseptörü
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
H&E	: Hematoksilen & Eozin
HER 2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Human Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HMG	: Yüksek mobilite grubu (High mobility group)
HR	: Hormon Reseptörü
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IHK	: İmmunhistokimya
İİAS	: İnce iğne aspirasyonu
LN	: Lenf nodu
MRM	: Modifiye Radikal Mastektomi
PAB	: Primer antikor (primary antibody)
PBS	: Phospat Buffer Saline
PCR	: Polimeraz chain (zincir) reaksiyonu
PR	: Progesteron reseptörü
RT-PCR	: Gerçek zamanlı (real time) Polimeraz chain (zincir) reaksiyonu
ShRNA	: Short hairpin RNA
SRY	: Seks belirleyici bölge ilişkili (Sex-determining region (SRY)- related)
TDLU	: Terminal Duktuler Lobüler Ünite
TF	: Doku Faktörü (tissue factor)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

ÖZET

Meme Karsinomlarında SOX2 Ekspresyonunun Patolojik ve Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması: İmmünohistokimyasal ve Moleküler Çalışma

Giriş ve Amaç: İnvaziv meme karsinomları tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kadınlarda en sık görülen ve ölüme neden olan malignitedir. Birçok tümörde olduğu gibi meme karsinomlarında da kendi kendini yenileme, proliferasyon ve farklılaşma özellikleri olan kanser kök hücreleri bulunmaktadır. Kanserli olguların yönetiminde, hedefe yönelik tedavilerinde; kök hücre belirleyicileri ve tümörögenesis ile ilişkisini araştıran çalışmalar günümüzde ivme kazanmıştır.

SOX2, pluripotent embriyonik kök hücrelerde kendi kendini yenilemeden sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Tümörögenizde, hücre çoğalması ve göçünde, apoptoziste, tümör metastazında, invazyonda ve ilaç direncinde rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda meme karsinomlarında SOX2'nin artmış tümör çapı, lenf nodu metastazı, yüksek nükleer derece gibi kötü klinikopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi, tümörögenizisin erken basamaklarında etkili olduğu, erken rekürrenste ve hastalıksız sağ kalım süresinin kısalmasında etkin olarak rol oynadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda invaziv meme karsinomlu olgularda SOX2 ekspresyon varlığının araştırılması, elde edilen verilerin klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnvaziv meme karsinomlu 99 olgunun parafin kesitlerinde immünohistokimya ve RT-PCR yöntemiyle SOX2 ekspresyonu araştırıldı.

Bulgular: SOX2 ekspresyonu 78 olguda (%78,8) saptanırken, 21 olguda (%21,2) izlenmemiştir. Çalışmamızda SOX2 ekspresyonu ile artmış tümör çapı ($p=0,011$), subtip ($p=0,018$), yüksek ki 67 proliferasyon indeksi ($p=0,0001$), lenfovasküler invazyon ($p=0,039$), lenf nodu metastazı ($p=0,038$), uzak metastaz ($p=0,038$), ileri evre ($p=0,030$) ve hastalıksız sağ kalım ($p=0,049$) arasında korelasyon bulunmuştur. Yaş, histolojik derece, hormon reseptör durumu ile anlamlı ilişki görülmemiştir.

Sonuç: Çalışmamızda; SOX2 ekspresyonu ile artmış tümör çapı, lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, ileri klinik evre, yüksek ki 67 proliferasyon indeksi ve kısa hastalıksız sağ kalım süresi gibi kötü prognostik faktörler arasında anlamlı ilişki saptanmış, SOX2'nin meme kanserli hastaların klinik takibinde ve bireysel tedavilerinin yönlendirilmesinde prognostik belirleyici olarak rutin kullanıma girmesinin uygun olabileceği düşünülmüştür. Bunun için geniş serilerle ve klinik tedavi basamaklarını da içine alan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: meme karsinomu, kanser kök hücre belirleyicisi, PCR, immünohistokimya, SOX2.

ABSTRACT

The Comparison of SOX2 Expression with Pathologic and Clinic Parameters in Breast Carcinomas: Immunohistochemical and Molecular Study

Aim: Breast cancer is the most common cancer among women and is one of the most common causes of cancer mortality worldwide and also in our country. Cancer stem cells are involved in breast carcinomas as well as in various tumors and have ability to self-renew, proliferation and differentiate into multiple cell lineages. Recently, studies about stem cell markers and cancer tumorigenesis have been increased owing to clinical benefits of targeted treatments. SOX2 is a transcription factor which is present in pluripotent stem cells during development, and responsible from self-renewal and precursor differentiation. In tumorigenesis, SOX2 is involved in cell proliferation and migration, apoptosis, tumor metastasis, invasion and drug resistance. In many studies it is shown that SOX2 is associated with poor clinicopathological factors in breast carcinomas such as increased tumor size, lymph node metastasis, high nuclear grade and has an effect in early stage of breast tumorigenesis, early recurrence and poor disease-free survival.

In our study, we investigated SOX2 expression in invasive breast cancer patients and aimed to search the obtained data with clinicopathological parameters.

Materials and Methods: SOX2 expression was investigated in paraffin sections of 99 invasive breast carcinoma cases by performing immunohistochemistry and RT-PCR methods.

Results: SOX2 expression was detected in 78,8 % of invasive breast carcinomas. SOX2 expression was statistically correlated with larger tumor size ($p=0,011$), subtype ($p=0,018$), high ki 67 proliferation index ($p=0,0001$), lymphovascular invasion ($p=0,039$), lymph node metastasis ($P=0,038$), distant metastasis ($p=0,038$), advanced stage ($p=0,030$) and poor disease free survival ($p=0,049$). There was no significant correlation between SOX2 expression and age, histologic grade, hormone receptor status.

Conclusions: In present study, SOX2 expression was correlated with poor prognostic factors such as tumor size, lymphovascular invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, advanced clinical stage, high ki 67 proliferation indices and shorter disease-free survival time. It is thought that SOX2 can be a useful prognostic marker in routine practice for management of individual treatments and clinical follow up of breast cancer patients. Forward studies including larger series with clinical treatment choices are needed to improve these results.

Keywords: breast cancer, cancer stem cell markers, PCR, immunohistochemistry, SOX2.

1. GİRİŞ ve AMAÇ:

Meme karsinomları kadınlarda en sık görülen ve ölüme neden olan malignitedir¹. Ülkemizde 2008 yılı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı verilerine göre bu oran % 40,7 olarak bildirilmiştir². Prognozunda yaş, tümör boyutu, lenfovasküler invazyon, evre, histolojik grade, lenf nodu tutulumu, hormon reseptör durumu, histolojik tip ve proliferasyon indeksi gibi faktörler rol oynar.

Tanı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi amacıyla, gerek invaziv gerekse in situ meme karsinomlarında etyopatogeneze yönelik moleküler çalışmalar ivme kazanmış ve son yıllarda onkogenik özellik gösteren transkripsiyon faktörleri (TF) üzerine yoğunlaşmıştır³⁻⁵.

Kök ve öncü hücreler tarafından eksprese edilen SOX2, geni 3q26.33 nolu kromozomda bulunan, seks belirleyici bölge (SRY) ilişkili bir TF'dir⁶. Organogenezis gibi gelişim basamaklarında kritik rol oynadığı ve uyarılmış *pluripotent* kök hücrelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷⁻⁹. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, SOX2'nin tümörögenезis, çoğalma, invazyon ve progresyonda da görev aldığı vurgulanmıştır¹⁰.

SOX2'nin meme karsinomlarındaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda; artmış tümör çapı, lenf nodu metastazı, yüksek nükleer derece gibi kötü klinikopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi bildirilmiştir. Ayrıca tümörögenезisin erken basamaklarında etkili olduğu, rekürrenste ve hastalıksız sağ kalım süresinin kısalmasında etkin olarak rol oynadığı gösterilmiştir¹¹⁻¹³.

Bu çalışmada, invaziv meme karsinomlu olgularda immünohistokimya, RT-PCR yöntemleri kullanılarak SOX2 ekspresyon varlığının ve elde edilen verilerin klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Karsinomu Genel Bilgiler

İnvaziv meme karsinomu çevre dokulara invazyon yapan, uzak metastaz yapma eğilimli malign epitelyal tümörler grubudur. Bu tümörlerin büyük çoğunluğunu terminal duktal lobüler ünitenin (TDLU) parankimal epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlar oluşturur. İnvaziv meme karsinomu farklı morfolojik, moleküler tiplere sahip, farklı klinik gidişleri olan heterojen bir tümörler grubudur.

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji:

Meme karsinomları; kadınlarda en sık görülen malign tümör olup, kadın kanserlerinin % 23'ünü, gelişmiş ülkelerde ise % 27'sini oluşturur¹⁴. Yıllık dünya çapında 1.000.000'dan fazla kadına tanı konmaktadır ve kadınlarda karsinomlardan ölümlerde en sık nedendir¹⁵.

Diğer birçok epitelyal tümörde olduğu gibi meme karsinomunda da risk yaşla beraber artış gösterir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi riskin yüksek olduğu bölgelerde kadınların % 6'sında 75 yaşından önce meme karsinomu gelişir. Bu oran Sahraaltı Afrika, Güney ve Doğu Asya (Japonya dahil) gibi gelişmekte olan ülkelere gelişmiş ülkelerin 1/3'ü kadardır. Bu bölgelerdeki ülkelere sadece Japonya gelişmiş bir ülke olmasına karşın buradaki insidans halen düşük seviyededir¹⁶. 1980 li yılların başına kadar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere meme kanseri gelişme riski artış göstermiştir. Az gelişmiş ülkelere de bu insidans meme görüntüleme yöntemlerinin ilerlemesiyle artış göstermiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde her 8 kadından biri yaşamı boyunca invaziv meme karsinomuna yakalanmaktadır. 2011 yılında 230.480 hasta invaziv, 57.650 hasta in situ meme karsinomu tanısı bildirilmiştir. Ülkede 2005 yılından itibaren meme karsinomu insidansı hormon replasman tedavisi (HRT) kullanımının azalmasına bağlı olarak her yıl % 2 oranında azalmaktadır¹⁷.

Ülkemizde kanser insidansları ile ilgili bilgiler yeterli düzeyde olmamakla birlikte 1999 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre meme karsinomu kadınlarda en çok görülen kanser türleri arasında % 24,1 oran ile birinci sırada yer almaktadır. Bu belgelere göre

Türkiye’de meme kanseri insidansı 7,32/100.000 oranındadır. 2008 yılı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı verilerine göre bu oran tüm kadın kansinomlarının % 40,7’sini oluşturmaktadır².

Meme kanseri çocukluk dönemi hariç, herhangi bir yaş grubunda görülse de, bazı familyal olgular dışında 25 yaşın altında nadiren ortaya çıkar. İnsidans, yaş ile birlikte artış gösterir¹⁸. Mammografi gibi tarama yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla meme kansinomlarının teşhisi kolaylaşmıştır. Ayrıca bu vakaların çoğunda tümör 2 cm’den küçük veya in situ karakterdedir¹⁹.

2.1.2. Etiyoloji

Meme kansinomu etyolojisinde hormonal faktörler, beslenme, radyasyon, genetik faktörler ve daha önceden var olan benign meme hastalıkları yer alır.

Yaş: İnsidans yaşam boyunca giderek artarak 75-80 yaşında pik yapar, 80 yaşından sonra ise risk azalır. Tanı anındaki ortalama yaş beyazlarda 61 iken, Afrikalı kadınlarda ise 46’dır. Kadınların sadece % 20’sinde tümör 50 yaşın altında görülür. Tüm ırklarda 25 yaşından önce tümör görülme riski oldukça düşüktür. Genç kadınlarda tümör nadir olarak görülmekle birlikte, bu tip hastaların yaklaşık yarısında östrojen reseptörü (ER) negatif, Her2 pozitifdir. Bu tip kanserler 40 yaşın üstündeki hasta tümörlerinin üçte birinden azını oluşturur²⁰.

Reprodüktif dönem: Erken menarş, nulliparite ya da geç yaşta doğum öyküsü, geç menapoz öyküsü ve infertilite olan kadınlarda meme kanseri riski artmıştır²¹. Menstrüel siklusu 13 yaşından önce başlayan kadınlarda, 13 yaşından sonra başlayan kadınlara göre risk 2 kat artar. Menapoza 55 yaşından sonra giren kadınlarda da risk; 45 yaşından önce menapoza giren kadınlara göre 2 kat artmıştır. Nullipar kadınlardaki relatif risk 1 olarak kabul edildiğinde, 20 yaşın altında ilk doğumunu yapan kadınlarda risk % 0,5 oranındadır²². İki yıldan daha fazla emzirme ve 30 yaşından önce doğum yapma koruyucu faktörler olarak gösterilmektedir²³.

Endojen hormonlar: Meme kansinomu gelişiminde rol oynayan seks steroidleri androjen, östrojen ve progesterondur. Bu steroid hormonlar proliferasyon ve diferansiyasyon fizyolojisine etki ederek karsinogenezisin erken aşamalarında etkili olurlar. Östrojen duktal sistemdeki büyüme ve proliferatif aktiviteyi düzenler ve

karsinogeneizde indifferansiye hücrelerin çoğalmasına etki ederek rol oynar. Progesteron hem hücre büyümesi hem de diferansiyasyonda görevlidir. Bu nedenle memedeki proliferatif etkinin en yüksek olduğu dönem ovaryan siklusta östrojen ve progesteronun sinerjik etki gösterdiği luteal fazdır. Premenapozal kadınlarda serbest veya total östradiol seviyesinin yüksekliği riski artırır²⁴. Normalde laktasyonu uyaran prolaktinin yüksek konsantrasyonları hem premenapozal hem de postmenapozal kadınlarda özellikle ER pozitif (+) meme kanseriyle ilişkili bulunmuştur²⁵. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) yolağındaki genetik varyasyonlar ise premenapozal kadınlarda meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir²⁶. Bunun yanında androjenler meme epitel proliferasyonunu deprese ederek meme karsinomundan koruyucu etki gösterirler.

Eksojen hormonlar: Oral kontraseptif kullanımı ve HRT yanı sıra normal ovaryan siklustaki normal seviyelerdeki reproduktif hormonlara uzun süreli maruziyet de meme kanseri riskini arttırmaktadır²⁷. Özellikle 10 yıldan fazla kombine oral kontraseptif kullanımı meme karsinomu gelişme riskini artırır. Risk kullanım süresince olduğu gibi ilaç kesildikten 10 yıl sonra da devam eder ve sonrasında giderek azalır²². Risk 20-34 yaşlar arasında kullanıldığında artarken, 35-44 yaşlar arasında oral kontraseptif kullanımı ile meme karsinomu gelişimi arasında ilişki bulunamamıştır²⁸. Postmenapozal hormon replasman tedavisi koroner arter hastalıkları ve osteoporoz riskini azaltmakla birlikte meme karsinomu riskini artırır. Kombine olarak östrojen ve progesteron kullanımında tek başına östrojen kullanımına göre risk daha fazladır²⁹.

Nutrisyonel durum: Adipö doku miktarı ve meme kanseri arasındaki ilişki kadınların menopozal durumlarıyla orantılıdır. Yüksek vücut kitle indeksi (> 24) ve günlük total kalori alımında artış postmenapozal kadınlarda premenapozal kadınların aksine meme karsinomu gelişimi için risk faktörüdür. Bu düşük risk durumu yüksek vücut kitle indeksine sahip premenapozal kadınlardaki düzensiz menstrüel ve anovulatuvar sikluslarla açıklanmaktadır³⁰.

Obezite ve fiziksel aktivite azlığı insülin direncine neden olur. Artmış insülin seviyeleri ovaryan ve adrenal seks steroidlerinin sentezine neden olur. Bu durumda karaciğerden seks hormonu bağlayıcı globülin salgılanması artar ve dolaşan seks hormon seviyesi yükselir. Plazmadaki androjenler de periferik yağ dokusunda östron ve östradiole dönüşür. Bu şekilde endojen östrojen maruziyeti artar. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGF-

BP) artışı da riski arttırır. Doymuş yağ asitlerinden ve özellikle de kırmızı etten zengin gıdalarla beslenme riski arttırırken; yüksek meyve ve sebze tüketimi koruyucu etkiye sahiptir. Sağlıklı bir diyet ve fiziksel aktivite artışıyla 10 kg ve daha fazla kilo kaybının meme kanseri riskini % 40'a varan oranlarda azalttığı bildirilmiştir. Yapılan son çalışmalarda sigara ve alkol tüketiminin hem pre hem de postmenapozal kadınlarda riski hafif-orta derecede arttırdığı bildirilmiştir. Fiziksel aktivite ise menopozal durumdan bağımsız olarak riski % 20-40 oranında azaltır¹⁶.

Radyasyon: DNA hasarına neden olur ve karsinogenezisin erken evrelerinde görev alır. 10-15 yıllık latent periyodu takiben karsinom gelişir. 2. Dünya savaşı sırasında Hiroshima ve Nagasaki'de radyasyona puberte döneminde maruz kalan kadınlar, ayrıca postpartum mastit nedeniyle radyoterapi alan kadınlar incelenmiş ve bu kadınlarda meme karsinomunun gelişme riskinin arttığı saptanmıştır²².

Genetik faktörler: Meme karsinomlarının % 20'sinde ailede meme karsinomu öyküsü vardır. Bu grubun $\frac{1}{4}$ 'ünde otozomal dominant kalıtım söz konusudur. Birinci derecede akrabasında (anne-kız kardeş) meme karsinomu öyküsü olanlarda risk çok daha fazladır. Aile öyküsü olan kadınlarda erken yaşta meme karsinomu görülme riski ve bilateralite daha sıktır. Bugüne kadar meme karsinomuna yatkınlık yaratan 6 gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır. En önemli 2 tanesi mutasyonlarında over karsinomu riskinin de arttığı, DNA hasar tamir genleri olan BRCA-1 ve BRCA-2 'dir. p53 mutasyonu (Li-Fraumeni), ataksi-telenjektazi, Androjen reseptör geni, Cowden sendromu diğer genetik faktörlerdir²⁸.

2.1.3. Meme Kanserlerinde Görüntüleme

40 yaş üzeri kadınlarda mamografi esas görüntüleme yöntemidir. Mamografide invaziv meme kanseri sıklıkla sınırları düzensiz- spiküler, kalsifikasyonların da eşlik edebildiği kitleler şeklinde görülür. 40 yaş altındaki kadınlarda daha dens meme varlığı nedeniyle USG daha sensitif bir yöntemdir.

2.1.4. Lokalizasyon

Meme karsinomlarının büyük çoğunluğu TDLU epitelinden köken alır. Sol memede tümör görülme olasılığı sağ memeye göre daha yüksektir (oran:1.07/1). Meme karsinomlarının % 40-50'si üst dış kadranda lokalize olur. Bunu sırayla santral, üst iç kadranda, alt dış ve alt iç kadranda izler¹⁶.

2.1.5. Klinik Özellikler

En önemli başvuru şikayeti ele gelen kitledir. Bunun yanı sıra daha önce var olan kitlede değişiklik, meme derisinin çekilmesi, meme başı şekil ve renk değişikliği, meme başı akıntısı, menstürasyon sonrası devam eden nodülerite, antibiyotik kullanımı ile geçmeyen meme inflamasyonu ve rekürren kistler de tümörü akla getiren bulgulardır. Postmenopozal kadınlarda, kitle ile birlikte tek taraflı ve inatçı ağrı şikayetinin olması tümörü işaret eden durumlardır. Bu belirtiler bazı benign meme hastalıklarında da olabilir. Bu yüzden meme görüntüleme yöntemleri eşliğinde ince iğne aspirasyonu (İİAS) ve/veya trucut biyopsiler ile kesin tanıya gidilmelidir. İİAS bulgularının şüpheli olması, ele gelmeyen kitle ve görüntüleme yöntemleriyle tespit edilen kalsifikasyonlarda kor biyopsi daha sensitiftir. Bu yaklaşımlarla kesin tanı verilemezse cerrahi olarak eksizyonel biyopsi gereklidir.

2.1.6. Meme Karsinogenezi Ve Tümör Progresyonu

Meme tümörlerinin gelişiminde en erken basamak; çoğalmayı önleyen uyarıların kaybı, öncü çoğalma faktörlerinde artma veya apoptoziste azalma ile meydana gelen proliferatif değişikliklerdir. Atipik proliferatif lezyonlarda (atipik duktal hiperplazi (ADH) ve atipik lobüler hiperplazi (ALH) gibi) hormon reseptör ekspresyonunda artış ve bir kısmında heterozigosite kaybı saptanmaktadır. İn situ karsinomların hepsinde heterozigosite kaybı mevcut olup yüksek dereceli olanlarında, morfolojik olarak nükleer irileşme, düzensizleşme ve hiperkromaziye neden olan, anöploidi formunda DNA *instabilitesi* görülmektedir. Karsinomların morfolojik ve biyolojik özellikleri genellikle in situ evresinde oluşmakta, bu yüzden çoğu vakada in situ lezyonu ile eşlik ettiği

invaziv karsinom arasında benzerlik saptanmıştır³¹. Progresyondaki son basamak ise in situ karsinomdan invaziv karsinoma geçisi tanımlayan karsinogenezdır³².

Günümüzde invaziv karsinoma neden olan spesifik genetik belirteçler tam olarak tanımlanamamıştır¹⁶. Meme tümörlerindeki heterojenite çeşitli hipotezler ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu konudaki en popüler iki kavram ‘Klonal değişim’ ve ‘kanser kök hücre hipotezi’dir³³. Klonal değişim modelinde, kanser hücrelerinin zaman içerisinde birçok farklı mutasyon kazandığı düşünülmektedir. Genetik geçişler ve doğal seleksiyon ile uygun hücreler tümöral ilerleme göstermektedir. Bu hipotezde, tümörün tek hücreden birçok mutasyon sonucunda oluştuğu savunulmaktadır. Tümör büyüdükçe genetik dengesizlik ve kontrolsüz çoğalma yeni mutasyonlara yol açmakta, tümör tarz değiştirmekte; bu da tümör heterojenitesine neden olmaktadır^{4,34}.

Bir diğer kavram olan kanser kök hücre hipotezinde ise normal kök hücrelerin epigenetik yönden bir dizi değişime uğrayarak “kanser kök hücre” oluşturduğu ve bu hücrelerin, tümörün başlangıç, ilerleme, tümör göçü, tedaviye direnç ve rekürrensinden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Kanser kök hücrelerinde de normal kök hücrelerdeki gibi sınırsız kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği bulunmaktadır. Bu özellikler tümörde izlenen hücre çeşitliliğine ve tümör heterojenitesine yol açmaktadır. Çoğu tümör hücresi kanser kök hücre yüzey belirteçlerini ekspres etmese ve kanser kök hücreleri tümör dokusundaki hücrelerin sadece küçük bir kısmını oluştursa da, tümör göçü ve tedaviye direnç bu hücreler aracılığıyla olmaktadır. Klonal değişim modelinde ise herhangi bir tümör hücresinden mutasyon gelişebileceği ve tüm tümör hücrelerinin tümör ilerlemesinden sorumlu olabileceği öne sürülmektedir³⁵.

Membrandaki yüzey işaretleyici proteinleri hücre tiplerini tanımlar. Benzer şekilde meme kanser kök hücreleri de yüzey işaretleyici olan CD44 proteini varlığı ile tanımlanmışlardır. Meme kanseri kök hücreleri; CD24³⁶⁻³⁷, Lin³⁸ ve B38.1³⁸ seviyelerinin miktarındaki azalma sırasında gösterilmişlerdir. Yapılan bir çalışmada B38.1 meme-over kanseri spesifik belirteci olarak adlandırılmıştır³⁸.

Meme kök hücreleri, serumu uzaklaştırılmış nöral kök hücre agregatlarından oluşan ve mamosfer olarak adlandırılan kültürlerde gösterilmiştir^{39,40}. Morrison ve ekibinin yaptığı epidemiyolojik bir çalışmada somatik meme kök hücrelerinin radyasyona maruz kaldığında mutasyona uğrayarak tümöre dönüştükleri izlenmiştir⁴¹.

Kanser kök hücrelerinin kendi kendini yenileme davranışı Notch, Wnt/ β -katenin ve Hedgehog (Hh) yolları ile olur (**Tablo 1**). Bu yollarındaki anormallikler tümöröenezde önemli rol oynarlar^{42,43,142}.

Tablo 1. Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki Sinyal Yolları¹⁴²

Notch	Hücrenin akıbetinin düzenlenmesiyle ilişkili: kök hücreler ve erken progenitör hücrelerde eksprese edilir.
Wnt/β-katenin	Kök hücrelerin kendi kendini yenilemesiyle ve hücre akıbetiyle ilişkili: epitelyal ve meme tümörlerinde, β -katenin, Wnt yolağında pro-onkojenik rol alır.
Hedgehog	Hem normal meme bezi gelişimi hem de meme kanserinde tümör oluşumu ve progresyonda görevlidir.

2.2. İnvaziv Meme Karsinomları

İnvaziv meme karsinomlarında patolojik evrenin belirlenmesi prognozu belirlemede ve hastaya uygulanacak tedaviyi yönlendirmede büyük bir öneme sahiptir. Meme karsinomlarında prognostik faktörler majör ve minör olarak gruplandırılabilir. Majör prognostik faktörler AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer–Amerikan Birleşik Kanser Komitesi) klinik evreleme sisteminde adı geçen faktörleri içerir^{29,44}. Minör prognostik faktörler ise hastanın kemoterapi ve/veya hormonoterapiden yarar görüp göremeyeceğine karar verilmesinde rol oynar.

Lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın invaziv tümörü 1 cm civarında olan olgular sistemik tedavilerden yarar görür. Lenf nodu tutulumu göstermeyen, tümör çapı küçük olan olgularda tedavi kararı için minör faktörler kullanılır²⁹. Aksiller lenf nodlarının durumu en önemli prognostik faktördür.

Tümör çapı makroskopik olarak belirlenebilir; ancak belirgin yaygın in situ karsinom varlığında daha doğru olan mikroskopik ölçüm kullanılmalıdır. Tümör çapının patolojik olarak belirlenemediği durumlarda radyolojik ölçüm de kullanılabilir. Multifokal tümörlerde tümör çaplarının beraber toplamı lenf nodu metastazı ile daha yakın ilişkili bulunmuş olmakla beraber, tümör evrelemesi yaparken en büyük odağın çapı kullanılmakta ve diğer odaklar rapora eklenmektedir⁴⁵.

Primer meme kanserlerinde Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) klinik ve TNM evrelendirmesi **Tablo 2** ve **Tablo 3**'de verilmiştir^{44,46}. Patolojik evreye ek olarak prognostik ve prediktif faktörler belirlenmiş olup bu faktörler, özellikle lenf nodu

negatif meme kanserlerinde önem kazanmaktadır⁴⁷. Farklı prognostik özellikleri nedeniyle meme kanseri; erken, lokal ileri ve metastatik olmak üzere üç büyük gruba ayrılmıştır. Meme kanserli olguların yaklaşık olarak üçte biri lokal ileri evrede karşımıza çıkmaktadır. Tanı sırasında operabl olan T3N1M0 dışındaki N2 tümörleri kapsayan Evre IIIA, T4 tümörleri içeren Evre IIIB ve N3 tümörlerin bulunduğu Evre IIIC bu grupta yer almaktadır.

Lokal ileri tümörler genellikle deri veya göğüs duvarına infiltrasyon bulguları ile ya da aynı taraf aksillada fiks lenf nodülleri ile ortaya çıkmaktadırlar. Lokal ileri meme kanserleri içerisinde en hızlı seyirli ve olumsuz prognoza sahip tümörler inflamatuvar karsinomlardır.

Tablo 2. AJCC, klinik evreleme⁴⁴

Stage 0: DCIS* ya da LCIS** (5 yıllık sağkalım % 92)
Stage I: Nodal tutulum olmaksızın (ya da <0,02 cm metastaz), 2 cm veya daha küçük çaplı invaziv karsinom (mikroinvazyon gösteren insitu karsinom dahil) (5 yıllık sağ kalım % 75)
Stage II: En fazla 3 pozitif lenf nodunun eşlik ettiği 5 cm veya daha küçük çaplı invaziv karsinom veya nodal tutulum göstermeyen 5 cm'den büyük invaziv karsinom (5 yıllık sağkalım % 87)
Stage III: 4 veya daha fazla pozitif lenf nodunun eşlik ettiği 5 cm veya daha küçük çaplı invaziv karsinom; nodal tutulum gösteren 5 cm'den büyük çaplı invaziv karsinom; 10 veya daha fazla sayıda nodal tutulum gösteren invaziv karsinom; ipsilateral internal mammarian lenf nodu tutulumunun eşlik ettiği invaziv karsinom; meme derisi ya da göğüs duvarı tutulumu ya da inflamatuvar karsinomun eşlik ettiği invaziv karsinom (5 yıllık sağkalım % 46)
Stage IV: Uzak metastaz gösteren karsinom (5 yıllık sağkalım % 13)

*duktal karsinoma in situ, **lobüler karsinoma in situ

Tablo 3. AJCC, TNM evreleme sistemi⁴⁴

EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE I	T1	N0	M0
EVRE IB	T0,T1	N1mi	M0
EVRE 2A	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE 3A	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
EVRE 3B	T4	N0, N1, N2	M0
EVRE 3C	Th	N3	M0
EVRE 4	Th	Nh	M1

2.2.1. İnvaziv Meme Karsinomlarında Prognostik Faktörler

1. Hastanın yaşı: Kadınlarda meme karsinomunun pik yaptığı yaşlar 75-80 arasındır. Tanı anındaki yaş ortalama 61’dir. 25 yaşın altında meme karsinomu oldukça nadirdir. Genç yaşta ortaya çıkan tümörlerde hormon reseptörleri negatif, Her2 pozitif olma eğilimindedir²⁰.

2. Tümörün in situ veya invaziv olması: İn situ karsinom memede sınırlıdır ve metastaz yapma özelliği taşımaz. Bu tip tümörlerde cerrahi ile kür sağlanır. İnvaziv karsinomların yaklaşık yarısında tanı anında lokal veya uzak metastaz eşlik etmektedir. Duktal karsinoma in situ (DCIS) ve bunlardan gelişen invaziv karsinomların histolojik dereceleri (grade) ve histolojik tipleri arasında önemli ilişki olduğu bulunmuştur⁴⁸.

3. Uzak metastaz: Uzak metastazlar kötü prognozün göstergesidir. Meme karsinomları en sık akciğer, kemik, adrenal bez, beyin ve meninkslere metastaz yapmaktadır. TNM sınıflamasında uzak metastaz ‘‘M’’ ile gösterilir⁴⁴ (**Tablo4**). Hormon tedavisine cevap veren hastalarda adjuvan terapiler ile uzun süreli remisyonlar ve palyasyonda başarı sağlanabilmesine rağmen, uzak metastazın varlığı tam kürü olanaksız kılmaktadır²⁹.

Tablo 4. AJCC, TNM sınıflamasında metastaz (M) durumu⁴⁴

M DURUMU	METASTAZ VARLIĞI
MX	Uzak metastaz varlığı bilinmiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut

4. Lenf nodu tutulumu: İnvaziv meme karsinomlarında uzak metastazın olmaması halinde aksiller lenf düğümlerinin tutulumu en önemli prognostik faktördür²⁹. Bir lenf nodunda metastaz bulunma olasılığı metastatik odağın çapı, lenf nodunun çapı ve makroskopide diseke edilen lenf nodu sayısı ile ilişkilidir. Hematoksilen&Eozin (H&E) ile morfolojik olarak negatif olduğu düşünülen bir lenf nodunda, seri kesitlerle ve immunhistokimyasal yöntemle metastaz çıkma olasılığı % 10–20 arasında değişmektedir⁴⁹.

TNM sınıflamasında bölgesel lenf nodu tutulumu ‘N’ klinik ve patolojik olmak üzere iki şekildedir. Klinik sınıflamada aksiller, supraklaviküler gibi tutulan lenf

düğümünün yeri ve klinik olarak (fizik muayene ve görüntüleme yöntemleriyle) tutulum olup olmaması esas alınırken, patolojik sınıflamada tutulan lenf düğümü sayısı ve mikrometastaz için metastatik odakın çapı önemlidir⁵⁰. Lenf nodu tutulumunun klinik ve patolojik sınıflandırılmaları **Tablo 5 ve Tablo 6**'da verilmiştir. Hastalıksız sağ kalım ve toplam sağ kalım pozitif lenf nodu sayısı arttıkça azalır⁵¹.

Tablo 5. AJCC, TNM sınıflamasında lenf nodu (N) durumu⁴⁴

N Durumu	Lenf nodu tutulumu (patolojik sınıflama)
pNx	Bölgesel lenf nodlarının durumu bilinmiyor
pN0	Bölgesel lenf nodları tutulmamış veya metastatik odak <0,2 mm
pN0(i+)	H&E düzeyinde veya immünohistokimya ile izole tümör hücreleri (<0,2 mm)
pN0(mol+)	Moleküler çalışmada tümör hücreleri için pozitif (RT-PCR) sonuç
pN1ml	1-3 aksiller lenf nodunda ve/veya internal mamaryan lenf nodunda sentinel lenf nodu örnekleme ile saptanan, klinik olarak belirgin olmayan mikroskopik metastaz varlığı
pN1mi	Mikrometastaz (Metastatik odak çapı: >0,2 mm ve <2,0 mm)
pN1a	1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz
pN1b	İnternal mamaryan lenf nodlarında metastaz
pN1c	1-3 adet aksiller ve internal mamaryan lenf nodlarına metastaz
pN2	4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz veya aksiller lenf nodu tutulumu negatifken klinik olarak internal mamaryan lenf nodunda metastaz
pN2a	4-9 adet aksiller lenf nodunda metastaz (en az bir odak en büyük çapında >2 mm)
pN2b	Aksiller lenf nodu tutulum yokken klinik olarak internal mamaryan lenf nodunda metastaz
pN3	≥10 adet aksiller veya infraklaviküler lenf nodunda metastaz veya ≥ 1 aksiller lenf nodu tutulumu yanı sıra klinik olarak belirgin ipsilateral internal mamaryan veya >3 aksiller lenf noduna ek olarak klinik olarak belirsiz ancak mikroskopik internal mamaryan veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodunda metastaz
pN3a	≥10 adet aksiller lenf nodunda metastaz (en az bir odak >2 mm) veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz
pN3b	≥1 adet aksiller lenf nodu metastazı varlığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mamaryan lenf nodu metastazı veya >3 aksiller lenf nodu metastazı varlığında sentinel lenf nodu örnekleme ile saptanan ancak klinik olarak belirsiz internal mamaryan lenf nodunda metastaz
pN3c	İpsilateral supraklaviküler lenf nodunda metastaz

Tablo 6. AJCC, TNM sınıflamasında lenf nodu (N) durumu⁴⁴

N Durumu	Bölgesel Lenf Nodülleri (Klinik Sınıflama)
N _x	Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır (örn. daha önce çıkartılmış)
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral lenf nodlarında metastaz (fikse değil)
N2	Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz
N2a	Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz
N2b	Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığı klinik olarak belirgin
N3	Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları)metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı.
N3a	ipsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz
N3b	ipsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında veya aksiller lenf nod(ları)nda metastaz
N3c	ipsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)nda metastaz

5. Tümör boyutu: Aksiller lenf nodu metastazı riski tümör boyutu ile doğru orantılı olarak artar. Boyutu bir cm'nin altında olan tümörlerde 10 yıllık sağ kalım % 90'ın üzerindeyken, iki cm'den büyük tümörlerde bu oran % 77'lere kadar düşer. Tümör çapı, lenf nodu tutulumundan sonra, en önemli ikinci parametre olup tek başına kullanılabilen en önemli prognostik faktördür⁴⁸. TNM sınıflamasında 'T' olarak ifade edilir; patolojik ve klinik sınıflamada benzer ölçütler kullanılır (**Tablo 7**). Multipl invaziv odak görülen olgularda, odaklar aynı kadranda ise multifokalite, farklı kadrarlarda ise multisentrisiteden bahsedilir. Multisentrik veya multifokal tümörlerde, AJCC evrelemesinde büyük boyutlu tümör odağı esas alınır. Literatürde yer alan bir çalışmada multifokal/multisentrik tümörü olan olgularda lenf nodu tutulumunun, tümör yüzey alanı ve hacmi eşit olan unifokal olgulara kıyasla anlamlı olarak fazla olduğu gözlenmiştir⁵⁰. Multifokalite/multisentrisite varlığı bağımsız bir prognostik aktör olmamakla birlikte tedavide hastaya yapılacak olan meme koruyucu cerrahi veya mastektomi kararının verilmesinde önemlidir⁵².

Tablo 7. AJCC, TNM sınıflamasına göre tümör çapı (T) evrelemesi⁴⁴

T Durumu	
TX	primer tümör değerlendirilemedi
T0	primer tümör yok
Tis	İn situ karsinom
Tis(DCIS)	İn situ duktal karsinom
Tis(LCIS)	İn situ lobüler karsinom
Tis(Paget)	invaziv tümör olmaksızın meme başının paget hastalığı olması
T1	2 cm veya daha küçük boyutlu tümör
T1mic	mikroinvazyon $\leq 0,1$ cm
T1a	$> 0,1 - \leq 0,5$ cm
T1b	$> 0,5 - \leq 1$ cm
T1c	$> 1 - \leq 2$ cm
T2	$> 2 - < 5$ cm çaplı tümör
T3	> 5 cm
T4	Herhangi bir boyutta ancak aşağıdakilerden en az biriyle uyumlu tümör
T4a	göğüs duvarı tutulumu
T4b	aynı memede deride ödem veya ülserasyon veya satellit nodül varlığı
T4c	T4a ve T4b'nin birlikte olması
T4d	inflamatuvar karsinom

6. Histolojik tip: Histolojik tiplendirme için yeniden düzenlenen WHO 2012 (World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü) sınıflaması kullanılmaktadır. Güncel sınıflama **Tablo 8'de** verilmiştir¹⁶. İnvaziv meme karsinomlarının çoğu invaziv duktal karsinom morfolojisindedir. Daha iyi prognozlu olan tübüler, müsinöz ve adenoid kistik karsinom gibi meme karsinomları düşük dereceli tiplerdir. Az diferansiye, taşlı yüzük hücreli ve inflamatuvar karsinomlar ile karsinosarkomlar ise memenin agresif davranışlı tümörleridir. İnflamatuvar karsinomlarda 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık % 11'dir. Pür medüller karsinom derecesi yüksek olduğu halde nispeten iyi prognoza sahip tümörlerdir. Mikst tümörlerde prognoz, baskın olan tip gibidir.

Tablo 8. Meme Tümörleri Klasifikasyonu (WHO 2012)¹⁶

• Epitelyal Tümörler - Mikroinvaziv karsinom - İnvaziv karsinom NST(spesifik tip olmayan) (eski sınıflamada İnvaziv duktal karsinom, NOS) ✓ Mikst karsinom ✓ Pleomorfik karsinom ✓ Osteoklastik dev hücreli karsinom ✓ Koryokarsinomatöz özellikleri olan karsinom ✓ Melanotik özellikleri olan karsinom - İnvaziv lobüler karsinom (klasik, solid, alveolar, pleomorfik, tubulolobüler, mikst) - Tübüler karsinom - İnvaziv kribriform karsinom - Medüller karsinom - Müsinöz karsinom ve bol müsin içeren diğer tümörler ✓ Müsinöz karsinom ✓ Kistadenokarsinom ve prizmatik hücreli müsinöz karsinom ✓ Taşlı yüzük hücreli karsinom - Nöroendokrin tümörler ✓ Solid nöroendokrin hücreli karsinom ✓ Apikal karsinoid tümör ✓ Küçük hücreli / yulaf hücreli karsinom ✓ Büyük hücreli nöroendokrin karsinom - İnvaziv papiller karsinom - İnvaziv mikropapiller karsinom - Apokrin karsinom - Metaplastik karsinomlar ✓ Saf epitelyal metaplastik karsinomlar ○ Skuamoz hücreli karsinom ○ İğsi hücre metaplazili adenokarsinom ○ Adenoskuamoz karsinom ○ Mukoepidemoid karsinom ✓ Mikst epitelyal/mezenkimal metaplastik karsinomlar - Lipidden zengin karsinom - Sekretuar karsinom - Onkositik karsinom - Adenoid kistik karsinom - Asinik hücreli karsinom - Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom - Sebaseöz karsinom - İnflamatuar karsinom - Lobüler neoplazi ✓ Lobüler karsinoma in situ - Intraduktal proliferatif lezyonlar ✓ Olağan duktal hiperplazi (Usual ductal hyperplasia) ✓ Düz epitelyal atipi (Flat epithelial atypia) ✓ Atipik duktal hiperplazi ✓ Duktal karsinoma in situ - Mikroinvaziv karsinom - İntraduktal papiller neoplaziler ✓ Santral papillom ✓ Periferik papillom ✓ Atipik papillom ✓ İntraduktal papiller karsinom ✓ İntrakistik papiller karsinom - Benign epitelyal proliferasyonlar ✓ Adenozis (varyantlar dahil) ○ Sklerozan adenozis ○ Apokrin adenozis ○ Blunt duktos adenozis ○ Mikroglanüler adenozis ○ Adenomyoepitelyal adenozis	✓ Radyal skar/kompleks sklerozan lezyon ✓ Adenomlar ○ Tübüler adenom ○ Laktasyon adenomu ○ Apokrin adenom ○ Pleomorfik adenom ○ Duktal adenom • Myoepitelyal lezyonlar - Myoepitelyozis - Adenomyoepitelyal adenozis - Adenomyoepitelyoma - Malign myoepitelyoma • Mezenkimal tümörler - Hemanjioma - Angiomatozis - Hemangioperisitom - Psödoangiomatoz stromal hiperplazi - Myofibroblastoma - Fibromatozis (agresif) - İnflamatuar myofibroblastik tümör - Lipom ✓ Anjiolipom - Granüler hücreli tümör - Nörofibrom - Schwannoma - Anjiyosarkom - Liposarkom - Rabdomiyosarkom - Osteosarkom - Leiomyom - Leiomyosarkom • Fibroepitelyal tümörler - Fibroadenom - Fillodes tümörü ✓ Benign ✓ Borderline ✓ Malign - Periduktal stromal sarkom, düşük dereceli - Meme hamartomu • Memebaşı tümörleri - Meme başı adenomu - Siringomatöz adenom - Meme başının Paget hastalığı • Malign lenfoma - Diffüz büyük B-hücreli lenfoma - Burkitt lenfoma - MALT tipi ektranodal marjinal-zon-B-hücreli lenfoma - Foliküler lenfoma • Metastatik tümörler
---	--

7. Histolojik Derece (Grade): İnvaziv duktal karsinomlar tübül ya da gland formasyonu oluşturmaları, nükleer pleomorfizm ve mitoz esas alınarak oluşturulan gradeleme sistemine göre derecelendirilirler. Bu sistem ilk kez Bloom ve Richardson tarafından 1957 de oluşturulmuş ve 1991’de Elston ve Ellis tarafından modifiye edilmiştir. Elston-Ellis modifikasyonunda apoptotik cisimcikler ve hiperkromazi gibi bulgular sınıflamadan çıkartılarak günümüzde de hala kullanılan modifiye Bloom-Richardson- Elston sistemi Nottingham derecelendirme sistemi şeklini almıştır⁵³ **(Tablo 9).**

Mitoz sayımı yapılırken kullanılan mikroskop alanları bilinmeli ve skorelama buna göre yapılmalıdır. Mitoz, en az 10 büyük büyütme alanında sayılmalı ve tercihen invaziv tümörün periferi ve/veya en yüksek sayım yapılan alanındaki sonuç kullanılmalıdır. Her mikroskopta görülen alanın çapı farklı olduğundan kullanılan mikroskoba göre sayım yapılmalıdır. Yine nükleer pleomorfizm skoru, en yüksek olduğu alana göre verilmelidir.

Yüksek histolojik derece, lenf nodu tutulumu ve tümör çapından bağımsız olarak, uzak metastaz ve kısa sağkalım süresi ile ilişkili bulunmuştur⁴⁹. Ayrıca histolojik derece kemoterapiye yanıt için de yararlı bilgi verir, bu yüzden prognostik olduğu kadar prediktif bir faktördür. Yapılan pek çok çalışmanın sonuçlarına göre; yüksek dereceli tümörler kemoterapiye daha iyi yanıt verirken, düşük dereceli tümörlerde hem adjuvan hem de neoadjuvan tedaviye yanıt daha kötüdür⁵⁴.

Tablo 9. Modifiye Bloom-Richardson sistemi Nottingham derecelendirme sistemi⁵³

Tübül yapma (%)	Skor
>75	1
10-75	2
<10	3
Mitoz (10 BBA*) (0,44 mm, 0,152 mm ²)**	Skor
0-5	1
6-10	2
≥11	3
Nükleer Pleomorfizm	Skor
Minimal (kromatin düzenli)	1
Orta şiddette (açık kromatin, nükleol varlığı)	2
Belirgin (hücre çapı ve şeklinde belirgin varyasyon ±bizar nükleuslar ve belirgin nükleoller)	3
Skor Toplamı	Histolojik Derece
3-5 puan	Derece 1
6-7 puan	Derece 2
8-9 puan	Derece 3

*:BBA: Büyük büyütme alanı. **: Mitoz sayısı kullanılan mikroskopun tipine göre değişmektedir.

8. Nekroz: Nekroz tümör boyutu ve derecesi ile ilişkilidir. Çeşitli yayınlarda nekrozun hem lenf nodu pozitif hem de lenf nodu negatif hastalarda önemli bir kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir.

9. Tümör hücre proliferasyon indeksi: Tümör derecelendirmesinde yer alan mitoz; DNA- Flow sitometri, timidin labeling indeks, S-faz fraksiyonu ölçümü, PCR metodları veya hücre siklusunda salınan proteinlerin (örn; Ki 67) immunhistokimyasal olarak tespit edilmesiyle ölçülebilir. Proliferasyon hızının yüksek olması kötü prognostik faktördür. Benign meme lezyonlarında Ki 67 pozitif (+) hücre oranı ortalama % 3-4 civarında olup, invaziv karsinomlardaki ortalama değeri ise % 16-17'dir. Ki 67 proliferasyon indeksi pek çok çalışmada hastalıksız ve genel sağ kalımla ters ilişkili bulunmuştur. Az diferansiye karsinomlarda ve komedo nekroz içeren invaziv duktal karsinomlarda en yüksek değere ulaşırken, invaziv lobüler ve müsinöz karsinomlarda daha düşük seviyededir. Medüller karsinomlarda genellikle % 50'nin üzerindedir. Yapılan çalışmalarda hormon reseptörleri negatif (-) olgularda, ki 67 indeksi daha yüksek olma eğiliminde olup bu durum kısa sağ kalım süresi ile ilişkili bulunmuştur⁴⁸.

10. Östrojen ve progesteron reseptör durumu: Östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) ekspresyonları, invaziv meme karsinomunda zayıf birer prognostik parametre olup meme karsinomlarının yaklaşık % 70-80'inde pozitifdir. Olumlu bir prognostik faktör olarak kabul edilir ve iyi prognozla ilişkilidirler. Adjuvan tamoksifene yanıtta kullanılırlar. ER (+)/PR (+) tümörlerde bu tedaviye yanıt oranı %

60-70, ER (-)/ PR (-) tümörlerde % 10 oranındadır. ER (+)/PR (-) tümörlerde ise oran yaklaşık % 40'tır. Hormon reseptörü negatif tümörlerde tedaviye yanıt daha az orandadır.

ER (+) tümörler daha yavaş büyümekle birlikte metastaz yapma potansiyelleri aynı oranda düşük değildir. Tru-cut ya da insizyonel biyopsi örneklerinde dokuların daha iyi fikse olması nedeniyle ER ve PR varlığının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesinin bu örneklerde yapılması; sonuçların daha sonraki eksizyon materyalindeki boyanma ile korele edilmesi ve metastaz ya da rekürens varlığında bu odaklarda immünohistokimyasal çalışmanın tekrarlanması önerilmektedir. Tümör hücrelerinin % 1-10'unda saptanan ekspresyonun bile hormonal tedaviye cevapla ilişkili olduğu bulunmuştur⁵⁵.

11. Her2 Onkojen Durumu: Her2 (CerbB2) meme kanserlerinin yaklaşık % 20-30'unda eksprese edilir. İmmünohistokimya, PCR veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi yöntemlerle tespit edilebilir. Gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu önemli bir prognostik faktör olarak kabul edilmiştir⁵⁶. Literatürdeki çoğu çalışmanın sonucuna göre Her2 pozitifliği kötü prognosisla ilişkili bulunmasına rağmen monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin) tedavi şansı doğmaktadır. Her2 belirlemesinde kullanılan bir algoritma vardır. Buna göre immünohistokimya ile başlayan bir algoritmik yaklaşım izlenmektedir ve 10'luk büyütmede $\geq$ %30 tümör hücresinde kuvvetli membranöz boyanma 3 (+) olarak değerlendirilmektedir. Tümör hücrelerinin % 30'undan azındaki membranöz boyanmalar veya inkomplet membranöz boyanmalar 2 (+), zayıf sitoplazmik pozitif boyanma 1 (+) kabul edilmektedir. Tüm 2 (+) sonuçlarda, floresan in situ hibridizasyon (FISH) (veya kromojenik in situ hibridizasyon- CISH) çalışması yapılarak gen amplifikasyonunun varlığının araştırılması gerekmektedir⁵⁷. Amerikan İlaç İdaresinin (FDA) HER2/neu için uygun gördüğü skrolama sistemi **Tablo 10**'da özetlenmiştir.

Tablo 10. FDA HER2/neu skrolama sistemi

HER2/neu Skrolama Sistemi (FDA)	
0	Boyanma yok
+1	Zayıf boyanma, tümör hücrelerinin % 30'undan azında zayıf boyanma
+2	Tümör hücrelerin en az % 10'unda zayıf membranöz boyanma
+3	Tümör hücrelerin en az % 30'unda kuvvetli komple membranöz boyanma

12. Lokal ileri hastalık: Günümüzde farkındalık ve görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi nedeniyle daha büyük boyutlu deriyi ya da göğüs duvarını invaze eden karsinomlar daha nadir olarak görülmektedir. Bu tip tümörlerin cerrahi eksizyonu oldukça zordur.

13. Lenfovasküler invazyon: Özellikle T1, lenf nodu negatif hastalarda önemli bir bağımsız prognostik faktör olup tümör komşuluğundaki meme dokusunda varlığı araştırılmalıdır⁵⁸. En önemli görevi aksiler lenf gangliyonu tutulum riskini göstermesidir.

14. Diğer prognostik faktörler: Geçmişte yapılan çalışmalarda; BRCA1 durumu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, in situ karsinom varlığı, tümör stromasındaki elastozis varlığı, cerrahi sınırların durumu, mikrodamar yoğunluğu, fibrotik odak varlığı ve p53 mutasyonu gibi faktörler ile de tümör prognozu arasında ilişki gösterilmiştir. Bunun yanı sıra farklı histolojik prognostik faktörlerin kombinasyonu ile oluşturulmuş indekslerden biri olan Nottingham prognostik indeksinde tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve histolojik derecelendirmeye bakılarak tümör iyi, orta ve kötü prognostik gruplara ayrılmıştır.

2.2.2. Meme Karsinomu Tedavisi:

Tedavide cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri kullanılır. Hangi tedavinin kullanılacağına tümörün tipi ve davranışına, hastalığın yaygınlığına ve evreye göre karar verilir. Cerrahi tedavi modifiye radikal mastektomi (MRM), basit mastektomi ve meme koruyucu cerrahi yöntemlerinden oluşmaktadır. Eğer hasta, tümör boyutu dışında diğer meme koruyucu tedavi kriterlerine uymakta ise evre IIA, IIB ve T3N1M0 tümörlerde neoadjuvant tedavi sonrası meme koruyucu cerrahi tedavi seçeneği de kendisine belirtilmesi gereken bir zorunluluk haline gelmektedir.

Radyoterapi daha çok postoperatif kullanılırken, nadiren primer tümör tedavisinde ve lokal rekürrenslerin kontrolünde de kullanılabilir. Kemoterapi özellikle de metastatik karsinomlu hastaların sağkalımında önemli etkiye sahiptir. En iyi sonuçlar kombinasyon kemoterapisi ile alınır. Hormon reseptörleri pozitif olan hastalarda Tamoksifen kullanımı ve Her2'si pozitif hastalarda Trastuzumab kullanımı hasta sağ kalımını

önemli ölçüde etkilemekte, tedavinin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır. Meme karsinomu farklı patolojik özellikler ve klinik davranışlar içeren farklı tiplerin meydana getirdiği heterojen bir hastalık grubudur. Bu heterojenitenin bilinmesi her bir olgunun bu evrimsel spektrum içerisindeki yerine ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını doğurur. Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik veriler ile morfolojiye dayalı olmayan bazı moleküler belirteçlerin saptanmasıyla olur⁵⁹.

2.2.3. Moleküler Sınıflama ve Prognostik Önemi:

DNA, RNA ve proteinlerdeki çok sayıda değişikliği inceleyen yeni teknikler sayesinde invaziv meme karsinomları biyolojik özelliklerine göre de sınıflandırılmıştır^{60,61}. Benzer histopatolojik özellikler göstermelerine karşın klinik gidişlerinin farklı olması ve çeşitli tedavilere farklı yanıtlar vermeleri nedeniyle birçok çalışma günümüzde bu yönde yapılmaktadır^{62,63}.

Meme karsinomları tümörün köken aldığı hücreler birbirinden farklı olduğu için heterojen bir tümör grubudur⁶⁰. Meme karsinomlarında DNA mikroarray yöntemi ile biyolojik ve klinik olarak bu heterojenite gösterilmiş, gen ekspresyonlarına göre 5 farklı moleküler alt tip saptanmıştır⁶⁴. Alt tiplerde normal meme parankimindeki lüminal (glandüler) ve bazal (myoepitelyal) hücrelere benzer ekspresyonlar gösterilmiştir. Bu alt tipler Luminal A, Luminal B, Her2 eksprese eden tip, bazal-benzeri, normal “breast-like” tip olarak sınıflandırılmıştır⁶⁵⁻⁶⁸. Hem Luminal A hem de Luminal B tümörler hormon reseptörlerini eksprese ederler. Ancak Luminal A tümörler daha çok östrojen reseptörü (ER) eksprese ederken (en bilinenler PR, GATA3, Bcl-2, CK8 ve CK18), Luminal B tip tümörlerde Her2/neu gibi proliferatif genlerin ekspresyonu fazladır. Luminal tip tümörlerin % 20’sinden azında p53 mutasyonu görülür ve çoğunluğu derece 1 tümörlerdir⁶⁹.

ER negatif karsinomlar ekspresyon kaybı neticesinde ya da normalde ER negatif olan hücrelerden gelişirler. Normal meme benzeri tümörler de ER negatif tümörlerdir. Bu tipte bazal epitelyal genlerin yüksek, lüminal epitelyal genlerin ise düşük miktarlarda eksprese edildiği grup olduğu bildirilmiştir⁷⁰.

Her2 eksprese eden tümörler ise genellikle az diferansiye tümörlerdir ve ER negatiftir. Bu gruptaki tümörlerde % 40-80 oranında p53 mutasyonu izlenmektedir ve

çoğunlukla derece 3 ve aksiller tutulumu olan tümörlerdir. Bazal hücre benzeri karsinomlar, myoepitelyal hücre diferansiyasyonunu düşündüren CK5, CK17 gibi bazal keratinler, e-kadherin, EGFR ve laminin ekspresyonu gibi özelliklere sahiptir^{71,72}. Bazal benzeri tipte ER ve Her2 negatiftir.

Prognostik açıdan subtipler arası önemli farklar bulunmaktadır^{73,74}. Bazal benzeri ve Her2 eksprese eden tip prognozu en kötü olan gruplar iken Luminal A en iyi prognozlu alt tiptir. Normal tipteki tümörler bazal benzeri olan gruptakilere göre, Luminal A tipindekilerin ise Luminal B'ye göre daha iyi prognoz gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda yaşa göre alt tip dağılımları incelenmiş ve gençlerde daha çok bazal benzeri tipin; yaşlılarda ise Luminal alt tipin daha sık görüldüğü saptanmıştır. Pre ve postmenopozal olgular ayrı ayrı değerlendirilmiş sonuç olarak moleküler subtipleme ile menapoz arasında ilişki saptanmamıştır⁷⁵. Yapılan birçok çalışmada bazal-benzeri grubun yüksek histolojik ve nükleer grade ile ilişkili olduğu bulunmuştur^{65,66,76}.

Nielsen ve arkadaşları 930 invaziv meme karsinomu olgusunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ER/PR, HER2, EGFR, CK5/6 antikorlarını içeren dördümlü immunhistokimyasal panelin, bazal benzeri tipi belirlemede sensitivitesinin % 76, spesifitesinin ise % 100 olduğunu göstermişlerdir. CK5/6 ve EGFR normal meme dokusunda myoepitelyal ve epitelyal hücre belirteçleri olup duktal epitelin bazal tabakasını boyarlar. Lenf nodu negatif meme karsinomlarında CK5/6 ekspresyonunun tümör çapı ve histolojik derecesinden bağımsız bir prognostik faktör olduğu rapor edilmiştir. Bazal keratin eksprese eden meme karsinomlarında prognoz daha kötü olduğu gösterilmiştir⁷¹.

Histolojik tipler açısından bakıldığında, medüller karsinomlar iyi prognozlu olarak bilinmelerine karşın, yaklaşık yarısının bazal benzeri grupta olduğu saptanmıştır. Metaplastik karsinomların çoğu da bazal benzeri grupla ilişkilidir⁷⁷. Bazal benzeri ve Her2 eksprese eden tiplerde ortalama tümör çapının lüminal gruplara göre daha büyük olduğu bulunmuştur. Ayrıca mitoz sayısı tek başına değerlendirildiğinde bazal benzeri tipte diğerlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir⁷⁸. En sık lenfovasküler invazyon yapan grubun Her2 eksprese eden tip olduğu bulunmuştur⁵². Lenf nodu metastazı yine en sık Her2 eksprese eden grupta görülmekle birlikte bazal benzeri gruptaki tümörlerin de lüminal A'ya göre daha sık lenf nodu metastazı yaptıkları bildirilmiştir⁶⁵. Aynı

şekilde uzak metastazın da en sık Her2 eksprese eden grupta olduğu saptanmıştır. Tüm meme kanserlerinin % 3'ü, ailesel geçiş gösterenlerin ise % 25'i BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonu ile ilişkilidir²⁹. Moleküler çalışmalarda, özellikle BRCA1 mutasyonu tespit edilen hasta grubunda, bazal benzeri tipte ilişki tespit edilmiştir⁷⁹.

2.3. SOX2'nin Moleküler Mekanizmalarla Onkolojik Potansiyeli:

Transkripsiyon gen ifadesinin ilk basamağıdır, belirli bir DNA ipliği üzerindeki bilginin RNA polimeraz enzimi aracılığı ile bir RNA molekülüne aktarılması işlemidir. RNA polimeraz enzimi, bu işlem sırasında aslında mRNA olarak adlandırılan bir RNA molekülünü sentezlemektedir. Sentezlenen bu mRNA molekülüne transkript denir. mRNA'nın sentezlendiği bu işleme de transkripsiyon denmektedir. Promotörler, transkripsiyon işlemi için gerekli olan ve RNA polimerazın sağlam bir şekilde bağlanabildiği özgün DNA parçacıklarını içerirler. Bu özgün DNA parçacıklarına RNA polimerazın yanı sıra, RNA polimerazın çalışmasını güçlendirebilecek proteinler, transkripsiyon faktörleri (TF) ile bağlanabilirler.

TF'ler spesifik gen ifadesinin düzenlenmesinde *promotör* dizilerine aktivatör ya da baskılayıcı olarak görev yapmak üzere, özgün DNA dizisini tanıyarak bağlanırlar. TF'ler; diferansiasyonda, yenilenmede ve organizmanın gelişimsel paternlerinde önemli genleri kodlayan moleküllerdir. Aşırı TF ekspresyonlarına sıklıkla malignitelere rastlanmış ve bu faktörlerin bazı spesifik kanser tipleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur⁸⁰.

Etiyoloji ve tümör progresyonlarındaki rollerinden dolayı TF'ler, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında günümüzde oldukça popülerdir. Yapılan araştırmalar normal epitelyal hücrelerde oluşan ve onkogenik özellik gösteren TF'ler üzerine yoğunlaşmıştır. Bir TF olan SOX2 *pluripotent* embriyonik kök hücrelerde kendi kendini yenilemeden sorumludur. İnsanlarda ilk defa 1994 yılında Stevanovic ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir⁸¹. SOX2 3q26.33 nolu kromozomda bulunur ve 317 aminoasitten oluşur. Ekspresyonu, kısıtlı spasyal-geçici pattern göstermektedir. Organogenezis ve bazı dokuların embriyogenik gelişiminde kritik rol oynamaktadır⁶. Gelişim sırasında kök ve öncü hücreler tarafından eksprese edilir⁶⁻¹³.

SOX2 gen ailesi yüksek mobilite grup (HMG) transkripsiyon faktörlerini kodlar⁶. Örneğin, SOX2'nin overekspresyonu, farelerin nöronal kök hücrelerinin

differentiasyonunu bloke etmektedir. Diğer taraftan da sinir kök hücrelerinde SOX2'nin azalması normalden daha erken bir dönemde hücre siklusundan çıkışa ve nöronlara differentiasyona neden olmaktadır⁸². SOX proteinleri hedef gende transkripsiyonel aktiviteye neden olarak etki gösterirler. SOX proteinlerinin onkojenik potansiyelini anlayabilmek için hedef tanımlanması şarttır^{6,82}.

2006 yılında Takahashi ve Yamanaka retroviral transfeksiyon yöntemiyle aktardıkları 4 genin (OCT4, SOX2, c-Myc ve Klf4) fare fibroblastlarını *pluripotent* hale getirdiğini bildirmişlerdir⁸³. Oct-4, Nanog ve Sox2, pluripotensinin devamını ve farklılaşmayı sağlayan genlerin baskılanmasını sağlayan, çekirdek düzenleyici ağdan meydana gelmektedir⁸⁴.

Bu genlerin yanında Chen ve ekibinin bir çalışmasında SOX2 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenen ve hücre proliferasyonunda rol alan CCND1 geni tanımlanmıştır. CCND1 geninin ve bu genin ürünü olan Siklin D1'in hücre siklusunda SOX2 gibi G1/S geçişini kolaylaştırdığını saptamışlardır⁸⁵.

Birçok tümör; hücrelerin (gen amplifikasyonu, mutasyon gibi genomik değişikliklere uğramasıyla) malign transformasyonu sonucu oluşur⁸⁶. Bir sonraki adım tümörojenik özellikler sergileyen hücrelerin klonal ekspansiyonudur. Bu seçilmiş hücreler hücre kontrol mekanizmalarından kaçarak hızla proliferasyon olurlar ve dokulara ilerlerler⁸⁷. Bu sözü edilen basamaklar kanser kök hücreleri (CSC) tarafından yönetilir. Günümüzde farklı kanser tiplerinde çok sayıda CSC tanımlanmış ve bunların klinik yararları araştırılmıştır. Kök hücreleri kendini yenileyebilme, proliferasyon ve farklılaşma özelliklerine sahiptirler. Normal dokudaki kök hücrelerdeki germ hattı varyasyonları, epigenetik değişiklikler, kök hücre sinyal komponentlerinin somatik mutasyonu sonucu kanser kök hücreleri meydana gelir. İn vitro tümör hücre kültürleri ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerinin konvansiyonel tedaviye dirençli olduğu bu nedenle bu hücrelerin rekürrens ve metastazdan sorumlu olduğu gösterilmiştir.

SOX2 aynı zamanda bir kök hücre belirleyicisidir ve kök ve öncü hücrelerin içinde ifade edilir¹⁰. SOX2 ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve yetişkin vücut hücrelerinde uyarılmış *pluripotent* kök hücrelerle ilişkili olduğu bulunmuştur^{8,9}. Kök hücre araştırmaları ve bunların klinik yararları; beraberinde bir TF olan sex belirleyici bölge (SRY) ilişkili yüksek mobilite grubu (HMG) ailesi üzerinde de odaklanılmasını

sağlamış ve SOX2'nin aşırı ekspresyonu kanser gelişimiyle ilişkili bulunmuştur⁷. SOX2 proteini SOXB1 grubunda ifade edilir ve bu aile N-terminal, HMG ve C-terminal olarak adlandırılan 3 grup bağlanma alanını içerir. SOX2'nin HMG alanı nükleer sinyallerle aktive olduğunda bu proteinin regülasyonunun gerçekleşmesine katkıda bulunur⁸⁸ (**Şekil 1**). SOX proteinleri erken embriyo döneminde eksprese edilerek embriyonik ve ekstra embriyonik hücre tiplerinde önemli roller oynarlar⁸⁹.

Aslında SOX2'nin onkojenik potansiyeli hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Spesifik DNA sekanslarına; hedef gen ekspresyonunun aktivasyonu veya inhibisyonu için bağlanırlar. Kanser hücrelerinde SOX2'nin transkripsiyonel aktivitesinin nasıl yavaşladığı büyük ölçüde bilinmemektedir. SOX2 bağlayıcı proteini olarak görev alan β kateninin yıkımı ile SOX2'nin transkripsiyonel aktivitesinin arttığı gösterilmiştir⁹⁰. Wnt/ β katenin yolağında SOX proteinlerinin rol aldığı gösterilmiştir. Bahsedilen tüm çalışmalar SOX2'nin onkojenik potansiyeline anlamaya yardımcı olmaktadır.

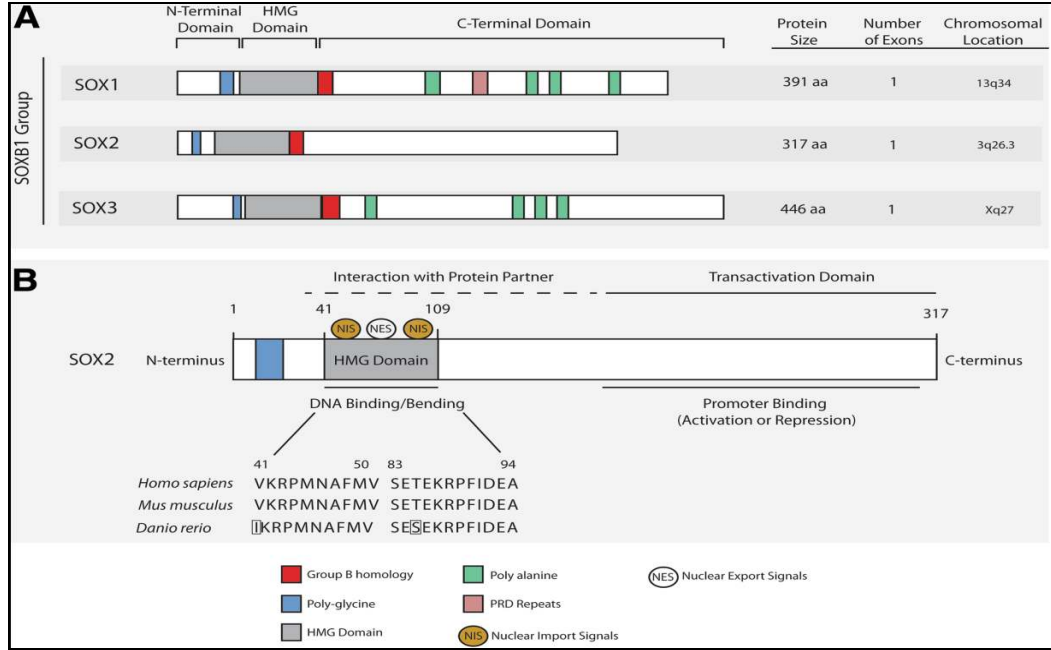
2014 yılında Weina ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada SOX2 ve rol aldığı kanserler toplanmıştır. Buna göre SOX2'nin hücre çoğalması ve büyümesinde, hücre göçünde, apoptoziste, ilaç direncinde, tümörögenizde, invazyonda ve tümör metastazında rol aldığı gösterilmiştir^{88,143} (**Şekil 2**).

Yapılan araştırmalara göre meme, kolorektal, sinonazal, özefagus, akciğer, over karsinomları, hepatosellüler karsinom ve melanomlarda da SOX2 amplifikasyonu gösterilmiştir. Ayrıca SOX2'nin mide ve prostat karsinomları ile ilişkisini bildiren çalışmalar mevcuttur^{91,92}. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında % 41, menenjiomlarda % 29 oranında SOX2 aşırı ekspresyonu saptanmıştır^{93,94}. SOX2; kolon karsinomlarındaki lenf nodu metastazı ile de ilişkili bulunmuştur⁹⁹.

Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar pankreatik inraepitelyal neoplazilerde karsinogenezin ileri aşamalarında; örneğin invazyon ve metastazda SOX2 aşırı ekspresyonunun rol aldığını düşündürmüştür⁹⁵. Aynı zamanda SOX2'nin belirli kanser türlerinin rekürrensinde rol oynadığı bildirilmiş ve akciğer skuamöz hücreli karsinomlarında karsinomun ortaya çıkmasında görevli normal doku genleriyle aynı kökenden geldiği gösterilmiştir⁹⁶⁻⁹⁸.

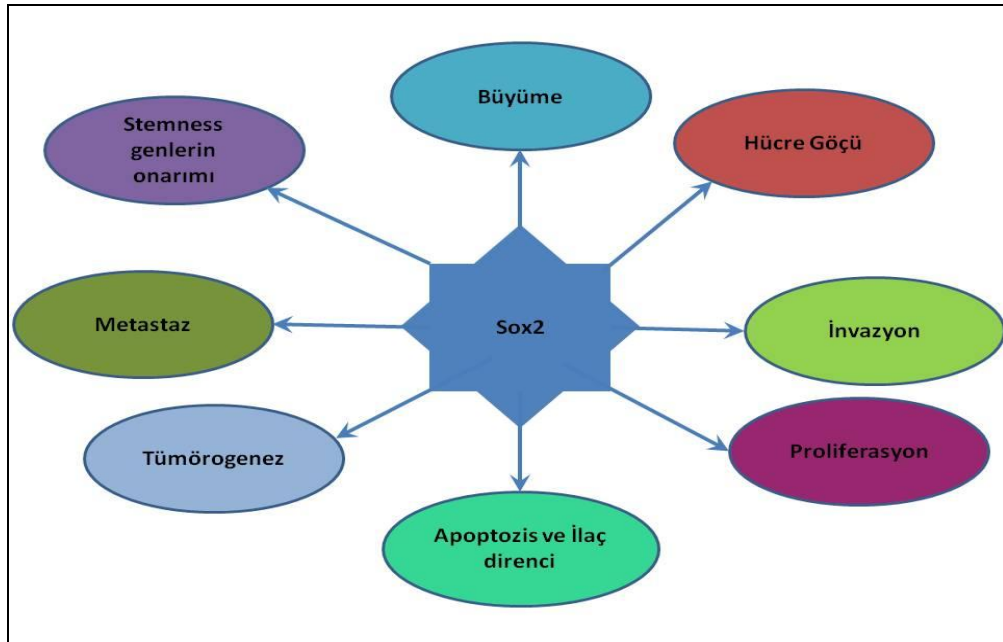
Tümörögeniz ve embriyonik kök hücrelerin onarımında görev almalarından dolayı SOX2'nin CSC için bir marker olarak rol oynadıkları gösterilmiştir. Yapılan

çalışmalarda SOX2 ekspresyonunun azalması sonucunda CSC fenotiplerinin bloke olduğu düşünölmektedir¹⁰⁰.



şekil 1. SOX ailesi şematik görünümü

(SOX2; SOX ailesinden SOXB1 de yer alır. SOX2 fonksiyonlarının düzenlenmesinde, sinyal alımı ve iletiminde HMG alanı proteinlerin bağlanması için önemlidir⁸⁸.)



şekil 2. SOX2'nin rol aldığı basamaklar¹⁴³.

2.4. SOX2'nin Meme Karsinogenezindeki Rolü:

Prognoz ve tedavi modalitelerindeki farklılıklar açısından meme kanserleri oldukça heterojen bir gruptur. Özellikle bazı subtiplerde tedaviye direnç ve agresif gidiş nedeniyle moleküler çalışmalar ivme kazanmıştır. Meme kanserleri kök hücreler bakımından zengindir. Bu durum tümör oluşumu, progresyonu ve kemoterapi ve/veya radyasyona direnç gibi kanser gelişim ve tedavi aşamaları ile ilişkili bulunmuştur^{101,102}.

Günümüzde, SOX2'nin meme dokusu gelişimindeki rolü yavaş yavaş aydınlatılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sağlıklı bir insanın meme dokusunda SOX2 ekspresyonu tespit edilmemiştir^{11-13,139-141}. Ancak, insanda meme kanserinde SOX2 ekspresyonuna yönelik kanıtlar artmaktadır. Bu durum SOX2'nin meme kanseri tümörögenезisinde rol oynadığı fikrini ortaya atmaktadır⁸⁵.

Meme tümörögenезisi sırasında SOX2'nin hücreleri üremeye zorladığı, in vivo tümörögenезiste kısmen G1/S geçişi ve düzenlemesini kolaylaştırarak ve β kateninle uyum içerisinde, CCND1 gibi efektör genlerin ekspresyonunda aktif rol aldığı toplanan verilerle desteklenmiştir^{13,85}. Meme karsinomlarında onkojenik TF'lerin aşırı ekspresyonu, kötü diferansiye ve triple negatif meme kanserlerinde gösterilmiştir¹⁰³.

Meme karsinomunda SOX2'nin fonksiyonel önemini anlamak için hücre hatlarında transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığını değerlendirmek gerekir. Kendini yenileme durumlarında SOX2 yüksek oranda kodlanır ve kök hücre yenilenmesi sırasında promotörü epigenetik olarak sessizliğe uğrar. Yani meme epitelyal hücrelerini de içine alan çoğu diferansiye hücrede SOX2 *promotörü* sessizdir¹⁰⁴. SOX2 meme kanser hücrelerinde hücre siklusundaki G1/S geçişini kolaylaştırarak ve CCND1 geninin *up-regülasyonuna* neden olarak proliferasyonu sağlamaktadır.

SOX2 ve β katenin sinerjistik etki göstererek meme karsinogenezinde rol alırlar. Kanser hücrelerinde CCND1 geninde aktivasyona β kateninle birlikte neden olur. CCND1 gen ürünü olan Siklin D1 proteini hücre siklusunda G0/G1 den S fazına geçişi düzenler. CCND1 amplifikasyonu/aşırı ekspresyonu yaklaşık % 50 meme karsinomu olgusunda gösterilen değişikliklerden biridir.

Meme karsinogenezinde SOX2 ve WNT/ β -katenin, AMPK/mTOR yolları ile ilişki gösterilmiştir^{137,138} (**Şekil 3**).

Chen ve arkadaşlarının çalışmasında SOX2'nin meme kanserlerinde aşırı ekspresyonunun mevcut olduğu ve tümörün derecesi ile SOX2 seviyeleri arasında

korelasyon olduğu, meme karsinogenezisinde SOX2 *promoter*larının görev aldığı bildirilmiřtir⁸⁵. Literatürde başka bir çalışmada aşırı SOX2 ekspresyonu; tüm invaziv meme karsinomlarında % 28, triple negatif meme karsinomlarında % 43 olarak saptanmıřtır¹³. Aynı alışmada SOX2' nin tümör oluşumu, progresyonu ya da kötü diferansiyasyon durumlarıyla ilişkili gen kaskadlarını aktive ettiğini düşündürmüştür.

Meme kanseri hücre hatları ile ilgili önceki çalışmalar shRNA aracılığıyla SOX2 yıkımının, Siklin D1'in *down regülasyonu* neticesinde hücre siklusunun durması ile sonuçlandığını göstermiřtir⁸⁶. Bahsedilen çalışmada hücre siklusundaki bu blokasyon heterograft modellerde tümör hücre proliferasyon inhibisyonuna eşlik etmektedir. RNA interferaz; canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin aktif olacağını ve nasıl aktif olacaklarını belirleyen ve kontrol eden bir sistemin ismidir. shRNA veya siRNA (küçük interferaz RNA'sı) olarak adlandırılan küçük RNA'lar, RNA interferazın faaliyetlerini artırmak veya azaltmak suretiyle etki gösterirler. İnhibitör RNA (RNAi) ile yaygın olan gen ifadesinin susturulmasında bazı potansiyel sınırlamalar vardır. Öncelikle meme dokusunda onkogenler yüksek oranda eksprese edilirler ve RNAi tarafından hepsinin aynı anda yıkılması zordur. İkinci olarak RNAi'ye yardımcı olan bu küçük RNA'lar geçici süre etki göstermelerinden dolayı RNAi'nin uzun dönem etkisini sınırlarlar.

Bu moleküllerin *promoter* ve onkojenik transkripsiyon için gerekli olan DNA düzenleyici bölgeleri direkt olarak susturabilmesi için hedef gende güçlü bir *down regülasyonu* ihtiyaç vardır¹⁰⁵. Bu sayede SOX2'nin yıkımı sağlanarak hücrelerin G0/G1 aşamasında bekletilmesi sağlanmış olur.

Sporadik lenf nodu negatif invaziv meme karsinomlarında özellikle bazal benzeri fenotipte¹³ ve çeşitli erken dönem postmenapozal karsinomlarda¹² SOX2 ekspresyonu saptanmıştır. Daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmasına rağmen SOX2 ekspresyonunun kötü differansiye tümörlerle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıřtır¹¹.

Tümör invazyonu kompleks bir olaydır. Malign hücreler bir araya gelerek primer olarak oluştukları alandan göç ederler¹⁰⁶. Birçok solid tümörde epitelyal- mezenkimal dönüşüm tümör invazyonu için önemli bir basamak olarak saptanmıştır^{107,108}. Bu dönüşüm sırasında malign epitelyal hücreler; hücre-hücre adezyonu, apikal-bazal polarite gibi karakteristik özelliklerini kaybederek artmış motilite ve invazyon yeteneği gibi mezenkimal özellikler kazanırlar^{109,110}. SOX2'nin de tümör invazyonunda rolü vardır. Bu etkiyi direkt olarak göstermede yapılan in vitro çalışmalar önemlidir¹¹¹. Wu

ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada ilk defa meme kanserinde epitelyal-mezenkimal dönüşümle invazyonda SOX2'nin düzenleyici olarak görev aldığı gösterilmiştir. Buna göre SOX2'nin, transkripsiyonel olarak aktif olup olmaması durumuna göre meme kanseri invazyonunda rolünün olduğu sonucuna varılmıştır¹¹².

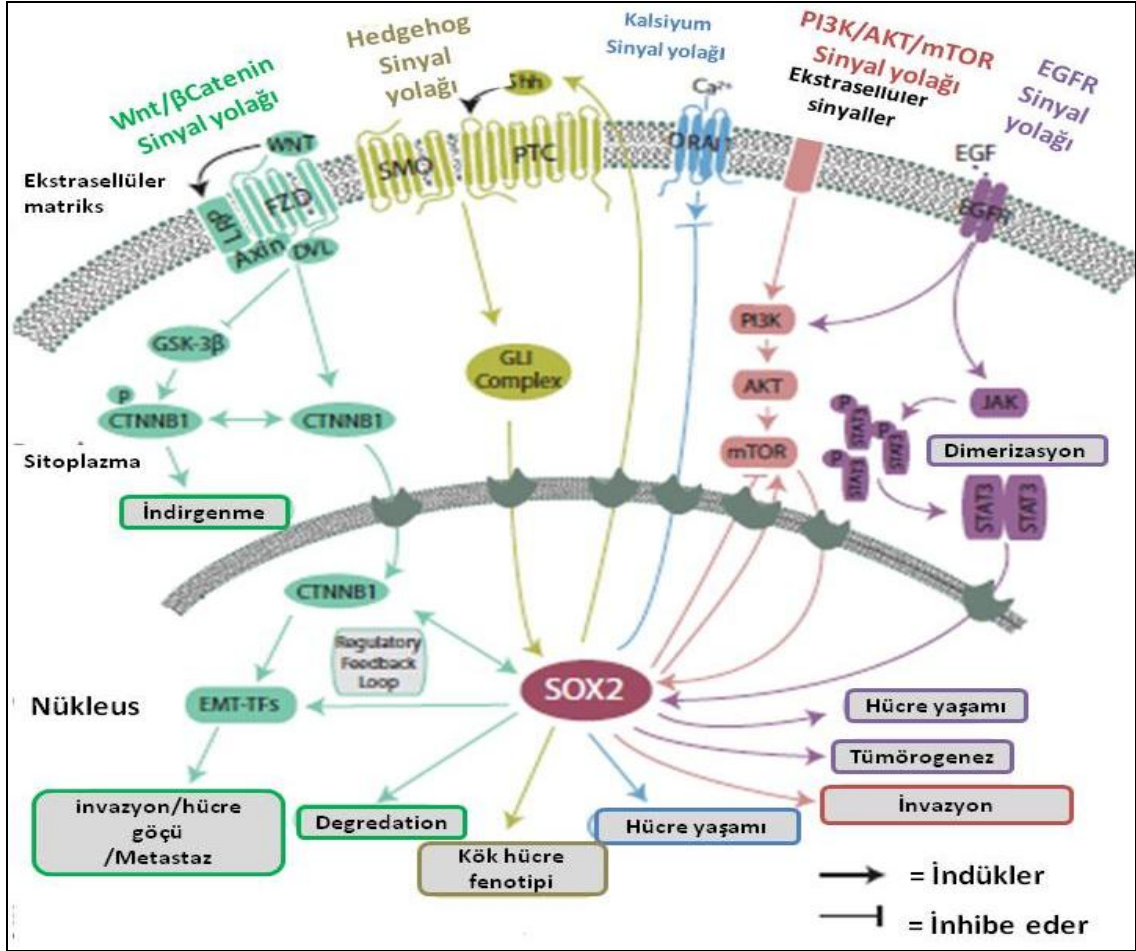
SOX2 ekspresyonunun meme kanseri açısından anlamının klinik olarak bütünüyle netleştirilebilmesi ve daha tanımlayıcı kanıtlara erişilebilmesi için, geniş kohort çalışmaları gerekmektedir. Buna göre meme karsinomlarında SOX2; hücre proliferasyonunda, koloni formasyonunda, invazyonda ve metastazda rol almaktadır.

Günümüze kadar meme karsinomu SOX2 ilişkisi üzerine yapılmış çalışmalar bazı klinik yararları beraberinde getirmektedir. Piva ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, meme kanserinde Tamoksifen direncinde kanser kök hücrelerindeki Wnt yolağı sinyal aktivasyonunun rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca ekspresyon seviyesi ile histolojik derece ve TNM evreleme sistemi korele bulunmuş, SOX2'nin metastaz için prognostik bir belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır¹¹³.

Prognostik parametrelerle olan ilişkiler gelecekte meme kanserinde hedefe yönelik alternatif tedaviler için yol gösterici olacaktır. Meme kanseri tedavisinde SOX2'den yararlanılması ile yeni tedavi fırsatlarına bir pencere açılacağı düşünülmektedir. Ancak SOX2'ye yapılacak direkt bir müdahale hücre döngüsündeki transkripsiyonel fonksiyon ve görevleri açısından birçok istenmeyen etkileri de beraberinde getirebilir. Bu nedenle SOX2 sinyal yollarını hedefleyen tedavilerin daha akılcı ve yararlı olacağı sonucuna varılmıştır. Literatürde prostat, akciğer adenokarsinomu ve oligodendrogliomlarda yapılan deneysel çalışmalarda SOX2'yi hedef alan yöntemler kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır^{114,115}. Ancak tedavi temelli ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; meme karsinomundaki prognozda önemli olan genlerin belirlenmesi için hala birçok çalışma devam etmektedir. Bu araştırmalarla meme kanser biyolojisinin anlaşılması ve tedavinin bireyselleştirilmesi amaçlanmaktadır¹¹⁴⁻¹¹⁷.

Bizim çalışmamızda invaziv meme karsinomlu olguların SOX2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması ve SOX2 ekspresyonu ile histolojik grade, lenf nodu tutulumu, evre, prognoz, remisyon, relaps ve genel sağ kalım arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 3. SOX2'nin hücre yaşamındaki etkileri ve görev aldığı yollar

(WNT/β-katenin, JAK/STAT3 sinyal yolları bunlardan en önemlileridir. Karsinomlarda SOX2 anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür⁸⁸.)

2.5. Polimeraz chain reaksiyon (PCR) Tekniğinin Temel Prensipleri

PCR tekniği, ilk olarak 1980'li yıllarda Cetus firması araştırmacıları tarafından genetik hastalıkların teşhisi için tanımlanmıştır. Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır¹¹⁸. Bu teknikte kalıp olarak kullanılan tek ya da çift zincirli DNA molekülüne ilave olarak, iki oligonükleotid primer, dNTP (deoksiribonükleozidtrifosfat), ısıya dayanıklı polimeraz enzimi ve buffer içerisindeki magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyulur¹¹⁹⁻¹²¹.

Primerler, hedef DNA'nın bilinen sekanslarına komplementer olarak önceden sentezlenmiş ortalama 20 baz çifti (bp) uzunluğunda olan spesifik oligonükleotid zincirleridir. Bu primerler ampifikasyon sırasında DNA dizisine bağlanmaktadır. dNTP

olarak dATP (deoksiadenozintrifosfat), dGTP (deoksiguanozintrifosfat), dCTP (deoksisitozintrifosfat), ve dTTP (deoksitimidintrifosfat) kullanılır. DNA Polimeraz enzimi olarak ilk basta *Esheria coli* DNA polimeraz I'in Klenow fragmanı kullanılmıştır. Ancak kullanılan bu enzimin, DNA dubleksinin kendi doğal formunu kaybettiği sıcaklığa erişmeden denatüre olarak aktivitesini kısa sürede kaybetmesi nedeniyle daha sonraları "*Thermus aquaticus*" adı verilen bir termofilik bakteri türünden elde edilen Taq polimeraz kullanıma sokulmuştur¹²². Bu enzimin özelliği termostabil olmasıdır. Bu durum, enzimin her siklusa eklenme gereğini ortadan kaldırarak reaksiyonun otomasyonunu kolaylaştırmıştır. Böylece tekniğin, spesifitesi, hassasiyeti bir hayli artırılabilmiştir. Yine, Taq DNA polimeraz enzimi, önceden kullanılan termolabil enzimlere oranla daha uzun DNA fragmanlarının amplifikasyonuna izin vermektedir. Termolabil enzimle yaklaşık 20 siklusa ürünlerin birikiminde bir plato mevcutken, Taq polimeraz çok daha ileri siklularda platoya sebep olmaktadır¹¹⁹.

PCR yöntemi, kısaca hedef bir gen ya da DNA bölgesinin, uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon geçirerek çoğaltılması (amplifikasyon) esasına dayanır^{123,124}.

PCR işlemi için mutlaka saf DNA kullanmaya gerek yoktur. Bir döngü sonucunda başlangıçta "n" olan DNA zincir sayısı 2n'e yükselir. Döngüler arka arkaya çok kez tekrarlanırken her bir döngünün ürünü, bir sonrakinde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde hedef DNA segmentinin miktarı 2 katına çıkar. Böylece çok az miktarda DNA'nın kısa zamanda milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını elde etmek mümkün olur¹²⁵.

PCR tekniğinde reaksiyon termal döngülerle gerçekleşmektedir. DNA'nın çift sarmal yapısını ayırmak için yüksek bir sıcaklık uygulanmakta ve ardından primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması için sıcaklık 72°C civarına (polimeraz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık) düşürülerek polimeraz enziminin ortamdaki dNTP'leri kullanarak primerleri uzatması sağlanmaktadır. Yeni DNA sentezinden sonra aynı primerler serbest kalarak tekrar kullanılabilir. Böylece DNA'nın logaritmik olarak sürekli amplifikasyonu sağlanabilmektedir¹²⁶.

2.5.1. PCR'da Temel Aşamalar:

2.5.1.1. Denatürasyon:

DNA molekülünün çift zincirli yapısının yüksek sıcaklık yardımıyla birbirinden ayrıldığı aşamaya denatürasyon aşaması denir. İlk denatürasyon tek döngü olarak 15 dakikaya kadar uygulanır. Bu basamakta PCR reaksiyonu içinde yer alan çift zincirli kalıp DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanır. Daha sonraki döngülerde 94-95 °C'de 0,5-2 dakika denatürasyon yeterlidir¹²⁷ (Şekil 4).

2.5.1.2. Bağlanma (*Annealing*):

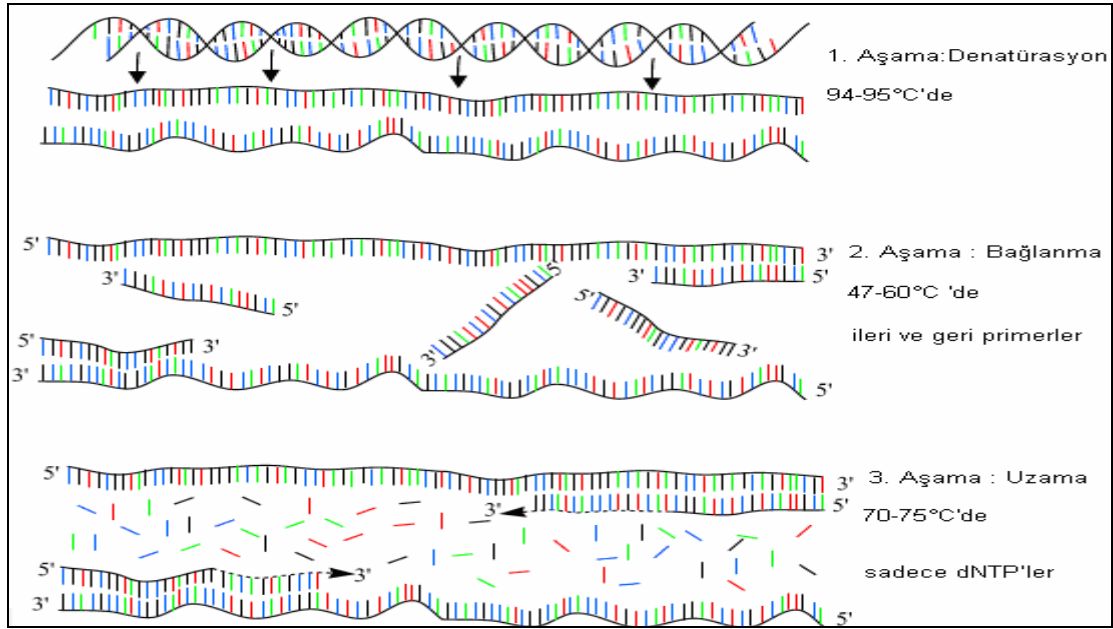
Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotid primerlerin (ileri ve geri primerler), ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlandığı aşamadır. Söz konusu primerler hedef DNA'nın her iki zincirinde spesifik bir bölgenin komplementeridir. Bağlanma çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir. Bağlanma sıcaklığı primerlere bağlıdır. Uygun olan yapışma sıcaklığı, amplifikasyon primerlerinin erime sıcaklığı (T_m) dikkate alınarak hesaplanır. Erime sıcaklığı (T_m), çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya dönüşümünün %50'sinin tamamlandığı sıcaklık noktası olarak tanımlanır. Erime sıcaklığını etkileyen faktörler esas olarak örneğin toplam kütlesi ve konsantrasyonudur.

T_m için önerilen pek çok hesaplama metodu mevcut olmakla birlikte optimal T_m değeri, en iyi deneysel olarak belirlenebilir. Yine T_m değeri hesaplama metodu seçilirken primerin baz büyüklüğü de dikkate alınır¹²⁵.

2.5.1.3. Uzama (*Extension*):

Zincir uzaması *Taq polimerazın* aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir. Genelde sıcaklık *Taq polimeraz* enziminin optimum faaliyet gösterdiği 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Uzama basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve

amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişmektedir.



Şekil 4. PCR'da temel aşamalar¹²⁶.

2.5.2. Real Time PCR (RT-PCR)

Moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan PCR tekniği daha sonraki yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi ile real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR; reaksiyon esnasında her bir PCR siklusunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.

Geleneksel PCR'ın uygulama alanlarını arttırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir¹²⁸.

RT- PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle klasik PCR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.

RT-PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler otomatik olarak devam etmektedir¹²⁹.

RT-PCR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde yaygın olarak kullanılan bir metottur. RT-PCR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir¹³⁰. Reaksiyon süresince gelişen amplifikasyon ve buna bağlı olarak artan floresanı bilgisayar monitöründen takip etmek mümkündür¹³¹. Dolayısıyla RT-PCR’da polimeraz zincir reaksiyonu boyunca her amplifikasyon döngüsünde çoğalan DNA miktarı ile paralel olarak artış gösteren floresans sinyaller toplanmakta ve bu sinyaller her bir örnek için sayısal değerlere çevrilmektedir^{119,132}.

Kalıp molekül amplifikasyonunu görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı RT-PCR değişik kaynaklarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da anılmaktadır¹³⁰.

RT-PCR, gen klonlama çalışmalarının yanı sıra teşhis, tanımlama ve gen ekspresyon analizlerinde de kullanılabilmektedir. Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan çok çeşitli real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak piyasada karşılaşılan en yaygın real-time PCR sistemleri; “Applied Biosystems 7700, Bio-Rad iQ5, Corbett Rotor-Gene, Eppendorf Mastercycler Realplex, Stratagene M x 3000p, Roche LightCycler’dir.

2.5.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Real-Time PCR’da Tespiti

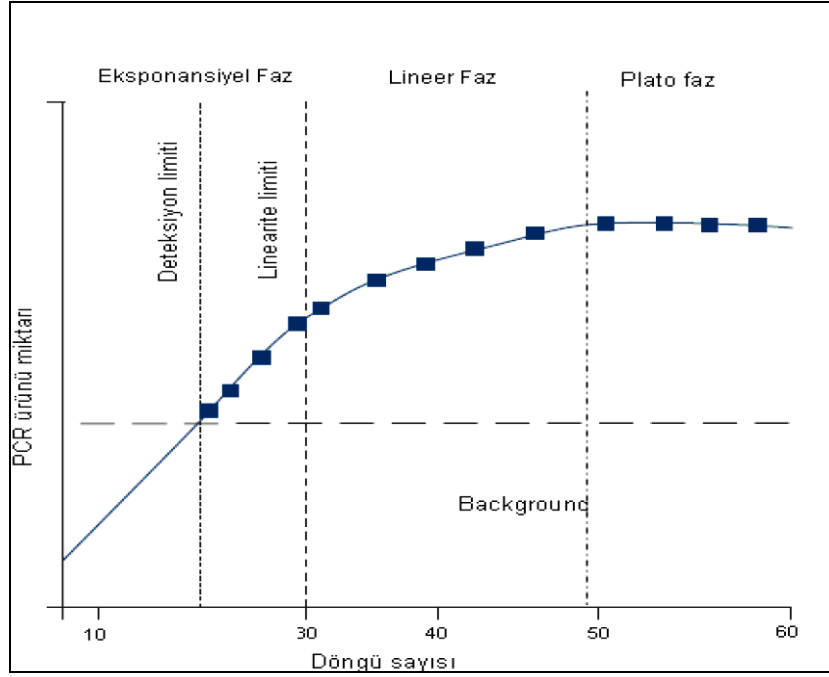
RT-PCR’da oluşan ürünü, verdiği floresans sayesinde raporlayan bir raportöre ihtiyaç vardır. Raportör, meydana gelen ürün miktarını yansıtan bir floresans sinyal oluşturmaktadır. İlk döngüler sırasında bu sinyal zayıftır. Ürün miktarı arttıkça sinyal miktarı da artış gösterir ve bu artış üstel olarak devam eder. Daha sonra bu artış sona erer ve doygunluk seviyesine ulaşır¹¹⁹⁻¹³¹.

Bu teknikte reaksiyonun her bir döngüsünde reaksiyon boyunca artan ve elde edilen PCR ürünüyle paralellik gösteren floresans ölçümü için, çift zincirli DNA’ya bağlanan boyalar veya floresans ışıma yapan diziye özgü problardan faydalanılır¹³¹⁻¹³³. Bu amaçla kullanılan farklı tip boyalar mevcuttur. Ancak hangi tip boya kullanılırsa kullanılsın bu boyaların öncelikle; çift zincirli DNA’ya bağlandığında artan floresans sinyal vermesi ve PCR reaksiyonunu inhibe edecek herhangi bir özellik göstermemesi gerekir. Çift zincirli DNA’ya spesifik boyalara örnek olarak; SYBR Green, Eva Green, BEBO, YOYO-1, TOTO-1 verilebilir ancak bu boyalar içerisinde en yaygın kullanıma sahip olan boya SYBR Green’dir¹¹⁹.

2.5.4. Real Time PCR’ın Temel Fazları

Real Time PCR’da ürün miktarı arttıkça oluşan sinyal miktarı da artmakta ve bu artış üssel olarak devam etmektedir. Bir süre sonra bu artış sona ererek doygunluk seviyesine ulaşmaktadır. Dolayısıyla tipik bir real time PCR’da temel 3 fazdan söz etmek mümkündür. Her bir döngüde ürün miktarının iki katına çıktığı faz “eksponansiyel faz”, reaksiyon komponentlerinin tükenmeye başladığı, reaksiyonun yavaşladığı ve ürünlerin degrade olmaya başladığı faz ise “linear faz” olarak adlandırılır. Reaksiyonun durduğu, daha fazla ürünün oluşmadığı ve uzun süre bu safhada kalındığında PCR ürünlerinin degrade olduğu faza ise “plato fazı (end point)” denilmektedir^{119,131} (**Şekil 5**).

Tipik bir real time PCR çalışmasında tüm örneklerle ait cevap eğrileri aynı aşamada doygunluk seviyesine ulaşır. Örneklerin cevap eğrilerini belli bir eşik floresans sinyal seviyesine ulaştırmak için gerekli amplifikasyon döngülerinin sayısı karşılaştırılarak farkları belirlenir. Eşik değere ulaşmak için gerekli döngü sayısı Ct (threshold cycle=eşik döngü değeri) değeri olarak adlandırılır¹¹⁹.



Şekil 5: Real Time PCR’da cevap eğrisi¹³¹.

2.5.5. Real Time PCR’da Kantitatif Analiz

Real time PCR’da kantitatif sonuçlar elde edilmesi amacı ile iki metod kullanılır. Bu metodlar; “standart kurve metodu” ve “orantılı Ct değeri metodu”dur Standart kurve metodunda kalıp DNA’nın seri dilüsyonları hazırlanırken orantılı Ct değeri metodunda buna ihtiyaç yoktur¹³⁴. Ancak standart kurve metodu ile çok küçük miktardaki örneklerle analizi yürütme şansı vardır¹³¹.

2.5.5.1. Standart Kurve Metodu:

Bu metodda hedef nükleik asit molekülünün (RNA, cDNA vs.) seri dilüsyonlarına ait logaritmik konsantrasyon değerlerine karşı elde edilen Ct değerleri kullanılarak standart bir eğri oluşturulur. Daha sonra bu çizilen eğri, hedef nükleik asit molekülünün miktarını anlamlandırmak üzere referans olarak kullanılır. Standart eğri bize, log RNA veya DNA’nın başlangıç miktarları arasındaki ilişkiyi lineer bir grafik olarak sunar¹³⁵. Böylece elde edilen bu kurve sayesinde konsantrasyonu bilinmeyen örneğin Ct değeri bulunarak konsantrasyonu tespit edilebilir.

2.5.5.2. Orantılı CT Değeri Metodu:

Real time PCR’da kantitatif sonuçların elde edilmesi için kullanılan diğer bir metod orantılı CT metodudur. Bu metod örneklerin Ct değerlerinin bir kontrol (veya kalibratör) ile kıyaslanması temeline dayanır. Bu metod $2^{-\Delta\Delta CT}$ metod olarak da adlandırılmaktadır. Söz konusu değer şu eşitlikle ifade edilir;

$$\Delta CT = \Delta C_{T, \text{örnek}} - \Delta C_{T, \text{referans}}$$

Burada; ΔCT örnek; endojen bir *housekeeping* gene göre normalize edilmiş herhangi bir örneğe ait CT değeri, ΔCT referans; endojen bir *housekeeping* gene göre normalize edilmiş kontrole (veya kalibratör) ait CT değeridir. $\Delta\Delta CT$ değerinin geçerli olması için hedef molekülün amplifikasyon etkinliği ile geçerli referansın amplifikasyon etkinliğinin eşit olması gerekmektedir¹³⁴.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi:

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı'nda 2004-2013 yılları arasında invaziv meme karsinomu tanısı alan ve tamamı kadınlardan oluşan 99 olgu çalışma için seçildi. Bu olgulardan 47'si invaziv duktal karsinom, 8'i invaziv lobüler karsinom, 42'si invaziv+in situ duktal karsinom, 2'si invaziv+insitu lobüler karsinom idi. Olguların tümüne hastanemizde veya dış merkezde biyopsi sonrası cerrahi eksizyon prosedürleri uygulanmıştı. Formaldehit fiksasyonlu, parafine gömülü bloklardan elde edilen Hematoksilen Eozin (H&E) boyalı lamalar arşivden çıkarılıp, yeniden değerlendirildi. İmmünohistokimya ve RT-PCR yöntemleri için invaziv karsinom alanlarından zengin en uygun bloklar seçildi.

Olguların anamnez, tanı tarihleri, hormon reseptör durumları, evre, lenf nodu tutulumlarının durumu, remisyon, relaps durumları ve takip süreleri hastanemiz otomasyon sisteminden, Onkoloji Bilim Dalı hasta takip dosyalarından ve telefon aracılığı ile kendilerinden ya da yakınlarından öğrenildi.

3.2. Etik Kurul

TTU20142719 protokol numaralı projemiz, 9 Mayıs 2014 tarihli toplantının 4 nolu kararı ile belirtilen yazı ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.3. Yöntem

3.3.1. RT-PCR Yöntemi

Olguların parafin bloklarından hazırlanan kesitler 1,5 ml eppendorf tüpüne kontaminasyon olmaması için şu şekilde alındı: önce kesit yapılan mikrotom cihazı hipolu gazlı bez ile silindi. Sonra temiz bir gazlı bez ile kurulandı. Parafin dokudan 10

µm'lik 3-5 adet ince kesit yapıldı. Kesitler steril kürdan yardımı ile 1,5 ml'lik DNase-RNase eppendorf tüpüne konulup aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı.

3.3.1.1. Deparafinizasyon

Parafin dokudan elde edilen 10 µm büyüklüğünde kesitler 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alındı. 800 µl Ksilen eklenip, çok kısa süreli aralıklarla vortekslendi. Üzerine 400 µl Absolü Etanol eklendi ve vortekslendi. 13.200 rpm 'de 2 dk santrifüj edildi ve pellete zarar vermeden süpernatant atıldı. Absolü Etanol kalıntısını almak için spin down yapıp pipetle iyice eppendorf tüpündeki sıvı alındı. Etanol kalıntısından kurtulmak için tüpün ağzı kağıt havluya dokunduruldu. Pelleti kurutmak için tüpün kapağı açık olacak şekilde 55 °C sıcaklıkta 10 dk bekletildi. RNA izolasyon protokolünün 1. basamağına geçildi.

3.3.1.2. RNA İzolasyon Basamakları

Deparafinizasyonu tamamlanan doku parçası temiz bir 1,5ml'lik eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 100 µl RNA Tissue Lysis Buffer, 16 µl % 10 SDS ve 40 µl Proteinaz K eklendi. Karışım vortekslendi ve spin yapıldı. 600 rpm'de çalkalanarak 85 °C sıcaklıkta 30 dk bekletildi. Süre sonunda tüp spin yapıldı ve 55 °C sıcaklığa düşmesi beklendi. 80 µl Proteinase K eklendi. Karışım vortekslendi ve spin yapıldı. 600 rpm'de çalkalanarak 55 °C sıcaklıkta 30 dk bekletildi. 325µl RNA Binding Buffer ve 325 µl absolü etanol eklendi. Karışım vortekslendi ve High Pure Filtreli tüplere alındı, altına High Pure Collection Tüp konuldu. Ardından 8000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Collection tüp değiştirildi. Filtrenin kuruması için 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. 100 µl DNaz working solution eklenip oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 500 µl Wash Buffer 1 eklendi. 8000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi. 500 µl Wash Buffer 2 eklenip 8000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi. Filtrenin kuruması için 13200 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Ardından High Pure Filtreli tüpün altına temiz bir eppendorf tüp konuldu. 25-50 µl arası Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve böylece total RNA eldesi gerçekleşmiş oldu.

3.3.1.3. c DNA Sentez Aşaması:

İlk aşamada; 9 µl total RNA, 2 µl Random Hexamer Primer, 2 µl PCR Grade water karıştırıldı. Bu karışım thermal cyclerda, 65°C’de 10 dk işleme alındı. 2. aşamada ise; 4 µl transcriptor revers reaksiyon buffer, 0,5µl koruyucu RNAaz inhibitor, 2µl deoksinükleotid miks, 0,5 µl transkriptör revers transkriptaz karışımı 1. aşamadaki ürün ile birleştirildi. Karışım thermal cyclerla 29 °C’de 10 dk, 48 °C’de 60 dk, 85 °C’de 5 dk işleme alındı ve cDNA sentezi tamamlandı.

3.3.1.4. RT-PCR Aşaması

Çalışmada referans gen olarak β Aktin kullanılmıştır. 1 µl primer & probe (real time ready) , 10 µl probe master, 4 µl grade water protokolüne her bir örnek için 5’er µl cDNA eklendi ve Roche Cobas 450 real-time cihazı ile çalışma yapıldı. Elde edilen değerler için orantılı CT metodundaki formüller kullanıldı. Kalibrasyon belirlenerek olguların sonuçları ekspresyon olup olmamasına göre değerlendirildi. Referans gen ve hedef gen ekspresyon eğrileri **Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11’de** gösterilmiştir.

3.3.2. Manuel İmmünohistokimya Çalışma Yöntemi

3.3.2.1. Dokuların Hazırlanması

Çalışma grubuna alınan %10’ luk formaldehit tespitli dokuların parafin bloklarından 4-5 mikronluk kesitler hazırlandı. Kesitler 60 °C’lik ısıda etüvde 30-45 dakika arası sürede üzerindeki parafin eriyene dek bekletildi. Kesitler, aynı etüv içerisindeki ksilollü şale içerisinde 10 dakika tutuldu. Etüvden çıkarılan kesitler oda ısısındaki, içerisinde ksilol buluna üç ayrı şale sonra % 95 alkol bulunan üç ayrı şalede beşer dakika tutularak distile suda iyice yıkanarak deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için % 3’lük H₂O₂ (hidrojen peroksit)’in distile sudaki solüsyonunda 5 dakika inkübe edildi.

3.3.2.2. Boyanma Aşamaları

Lamlar içerisinde sitrat buffer solüsyonu (pH 6) bulunan mikrodalgaya dayanıklı özel şalelerde sıralanarak Beko marka 1550 model mikrodalga fırında medium konumunda yedişer dakika 3 kez çevrilerek inkübe edildi. Daha sonra oda ısısına alınarak 40-45 dakika soğumaya bırakıldı. pH 7,2-7,4 PBS (0,01M Phosphate Buffer Saline)'de 3-5 dakika yıkandı. Doku çevresi silinerek dokular nemli bir ortamda yatay konularak üzerine PAB (primary antibody); Mouse monoklonal Anti-SOX2 Antibody (57CT23.3.4) damlatıldı. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra sekonder antibody (biotinli) damlatılarak 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra Peroxidase-strept avidin damlatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS'de 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindi.

Daha sonra AEC kromojen damlatıldı. 5-20 dakika sonra mikroskop altında boyanma olup olmadığı kontrol edilerek dokular çeşme suyuna alındı. Mayer Hematoksilende 1-3 dakika zemin boyaması yapıldı ve çeşme suyunda 3-5 dakika yıkandı. Kesit çevresi silindi ve su bazlı kapatma maddesi (Dako) ile kapatıldı.

3.3.2.3 İmmünohistokimya Skorlama Metodu

İmmünohistokimyasal çalışmada pozitif kontrol olarak akciğer skuamöz hücreli karsinomu kullanılmış ve nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir. SOX2'nin pozitifliği semikantitatif bir metod uygulanarak değerlendirilmiştir. Buna göre; boyanan tümör hücresi yoksa skor 0, % 1-4 SOX2 pozitif tümör hücresi varsa skor 1, % 5-49 SOX2 pozitif tümör hücresi varsa skor 2, $\geq$ %50 SOX2 pozitif tümör hücresi varlığında olgular skor 3 olarak değerlendirilmiştir. Cut-off değeri % 1 veya % 5 olarak alınmıştır.

3.3.3. İstatiksel Analiz:

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17,0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test ya da Fisher test istatistiği kullanıldı. Gruplar arasında

sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, parametrik dağılım ön şart varsayımı sağlayan değişkenler için Student T test, parametrik dağılım ön şart varsayımı sağlamayan değişkenler de Mann Whitney U testi kullanıldı. Sağ kalım eğrisi için Kaplan Mayer yöntemi ve gruplar arasındaki sağ kalım farklılıklarını hesaplamak için Long-rank testi uygulandı. Değişkenler arasındaki korelasyon Spearman'ın korelasyon katsayısı ile belirlendi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi (p değeri) 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Demografik Dağılımı:

Bu çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalında 2004-2013 yılları arasında meme karsinomu tanısı alan tamamı kadınlardan oluşan 99 olgu seçilmiştir. Değerlendirmeye aldığımız 99 olguda en genç hasta 23, en yaşlı hasta 83 yaşında olup ortalama yaş 52,7'dir. Bu olgulardan 47'si (% 47,5) invaziv duktal karsinom, 42'si (% 42,4) invaziv duktal karsinom+ in situ duktal karsinom, 8'i (% 8,1) invaziv lobüler karsinom, 2'si (% 2) invaziv lobüler karsinom+ in situ lobüler karsinomdur. 89 olguda (% 89,9) duktal tip, 10 olguda (% 10,1) lobüler tip karsinom vardır (**Resim 1, Resim 2**).

44 olguda (% 44,4) sağ, 54 olguda (% 54,5) sol, 1 olguda (% 1,1) hem sağ hem de sol memede tümör saptanmıştır. 14 olguda (% 14,1) multifokalite mevcuttur.

Tüm olgulara lenf nodu diseksiyonu yapılmıştır. 74 olguda (% 74,7) lenfovasküler invazyon izlenmiş, 77 olguda (% 77,8) da lenf nodu metastazı saptanmıştır. 22 olguda (% 22,2) lenf nodu metastazı görülmemiştir. 18 olguda (% 18,2) uzak metastaz mevcuttur.

En küçük tümör çapı 1 cm, en büyük çap ise 8,3 cm olup ortalama çap 2,4 cm'dir. 38 olgu (% 38,4) T1, 54 olgu (% 54,5) T2, 6 olgu (% 6,1) T3 ve 1 olgu (% 1) T4'dür.

Çalışmamızda TNM evreleme sistemi kullanılmış, buna göre 6 olgu (% 6,1) Evre I, 23 olgu (% 23,2) Evre IIA, 19 olgu (% 19,2) Evre IIB, 24 olgu (% 24,3) Evre IIIA, 5 olgu (% 5,1) Evre IIIB, 4 olgu (% 4) Evre IIIC, 18 olgu (% 18,2) Evre IV olarak belirlenmiştir. Yirmi dokuz olgu (% 29,3) erken evre, 52 (% 52,5) olgu lokal ileri evre ve 18 olgu (% 18,2) metastatik evre olarak gruplandırılmıştır.

Olgular modifiye Bloom-Richardson derecelendirme sistemiyle histolojik derecelerine göre gruplandığında; 58'i (% 58,6) nükleer derece (Grade) II, 41'i (% 41,4) nükleer derece (Grade) III'dür.

Tanı anında immünohistokimyasal yöntemle uygulanan hormon reseptörleri ER, PR, Cerb-B2 ve bazal belirteç ekspresyonlarına göre olgular subtiplerine ayrılmıştır. 12 olguda (% 12,1) ER negatif, 87 olguda (% 87,9) pozitif saptanmıştır. 29 olguda (% 29,3) PR negatif, 70 olguda (% 70,7) PR pozitifdir. Cerb-B2, 73 olguda (% 73,7) pozitif,

26 olguda (% 26,3) negatif bulunmuştur. İki olguda hormon reseptörleri negatif olup, bazal belirteçlerle boyanma saptanmıştır. Buna göre; 26 olgu (% 26,3) Luminal A, 63 olgu (% 63,6) Luminal B, 8 olgu (% 8,1) Cerb-B2 eksprese eden tip, 2 olgu (% 2) bazal benzeri tip olarak sınıflandırılmıştır.

Bu çalışmada Ki 67 için eşik değer % 15 olarak alınmıştır. 29 olgu (% 29,3) düşük, 70 olgu (% 70,7) yüksek Ki 67 proliferasyon indeksine sahiptir.

Olguların takip süreleri en az 9,5 ay, en çok 123,7 ay olup ortalama 57,6 aydır. 61 olguda (% 61,6) remisyon, 24 olguda (% 24,2) relaps izlenmiştir. Çalışma başlangıcında 83 olgu (% 83,7) sağ olup, 16 olgumuz (% 16,2) eks olmuştur. Eks olan toplam 16 olgunun 9'u (% 56,2) tanı anında metastatik, 6'sı (% 37,5) lokal ileri evrededir.

Normal meme dokusuna sahip kontrol grubunun tamamında SOX2 ile boyanma görülmemiştir.

İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan SOX2; 29 olguda (% 29,3) skor 1, 30 olguda (% 30,3) skor 2, 19 olguda (% 19,2) skor 3 olarak değerlendirilmiş, 21 olguda SOX2 ile (% 21,2) hiç boyanma izlenmemiştir (**Resim 3- Resim 7**).

RT-PCR yöntemiyle 78 olguda (% 78,8) SOX2 ekspresyonu saptanmış, 21 olguda (% 21,2) ve kontrol grubunda SOX2 ekspresyonu izlenmemiştir. Hesaplanan $\Delta\Delta CT$ değerlerine göre 17 olguda (% 17,2) yüksek, 61 olguda (% 61,6) düşük ekspresyon saptanmış, 21 olguda (% 21,2) ekspresyon görülmemiştir (**Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11**).

Verilerin demografik dağılım tablosu **Tablo 11**'de verilmiştir.

Tablo 11: Verilerin demografik dağılım tablosu.

	n	%
Tanı		
İnvaziv duktal karsinom	47	47,5
İnvaziv lobuler karsinom	8	8,1
İn-sitduktal+invaziv duktal karsinom	42	42,4
İn-situ lobuler+invaziv lobuler karsinom	2	2,0
Subtip		
LuminalA	26	26,3
LuminalB	63	63,6
HER2	8	8,1
Bazal benzeri	2	2,0
Lenfovasküler invazyon		
Yok	25	25,3
Var	74	74,7
Lenf nodu Metastazi		
Yok	22	22,2
Var	77	77,8

Tablo 11 devamı

Uzak Metastaz		
Yok	81	81,8
Var	18	18,2
T		
T1	38	38,4
T2	54	54,5
T3	6	6,1
T4	1	1,0
N		
N0	22	22,2
N1	38	38,4
N2	25	25,3
N3	14	14,1
M		
M0	81	81,8
M1	18	18,2
Evre		
EVRE1	6	6,1
EVRE2A	23	23,2
EVRE2B	19	19,2
EVRE3A	24	24,2
EVRE3B	5	5,1
EVRE3C	4	4,0
EVRE4	18	18,2
ER		
Negatif	12	12,1
Pozitif	87	87,9
PR		
Negatif	29	29,3
Pozitif	70	70,7
cerbB2		
Negatif	26	26,3
Pozitif	73	73,7
Ki-67		
Düşük	29	29,3
Yüksek	70	70,7
SOX2 ihk*		
Skor 0	21	21,2
Skor 1	29	29,3
Skor 2	30	30,3
Skor 3	19	19,2
SOX2 RT-PCR		
Var	78	78,8
Yok	21	21,2
ΔACT		
Ekspresyon yok	21	21,2
Düşük ekspresyon	61	61,6
Yüksek Ekspresyon	17	17,2
Hastalık durumu		
Remisyon	61	61,6
Relaps	24	24,2
Yaşıyor hastalık var	6	6,1
Son durum		
Sağ	83	83,8
Eks	16	16,2

*ihk: immünohistokimya

4.2. İmmünohistokimyasal ve RT-PCR ile elde edilen SOX2 Ekspresyonunun Klinikopatolojik Parametrelerle Karşılaştırılması:

Yaş: SOX2; < 50 yaş olguların 30'unda (% 38,5) pozitif, 6'sında (% 28,6) negatif saptanmıştır. ≥ 50 yaş olguların 48'inde (% 61,5) SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Yaş ile SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,454) (**Tablo 12**).

Tablo 12: SOX2 (+) liği ile olguların yaşının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

	SOX 2 (-)		SOX 2 (+)		P değeri
	n	%	n	%	
Yaş					
< 50	6	28,6	30	38,5	0,454
≥ 50	15	71,4	48	61,5	

Tümör çapı: SOX2 ekspresyonu ≤ 2cm olguların 33'ünde (% 42,3) görülmüş olup, 13'ünde (%61,9) negatif bulunmuştur. Tümör çapı ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,141) (**Tablo 13**).

Tablo 13: SOX2 (+) liği ile olguların tümör çapının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

	SOX 2 (-)		SOX 2 (+)		P değeri
	n	%	n	%	
Tümör Çapı					
≤ 2cm	13	61,9	33	42,3	0,141
> 2cm	8	38,1	45	57,7	

Histolojik tip: Duktal karsinomlu olguların 69'unda (% 88,5), lobüler karsinom tanıılı olguların 9'unda (% 11,5) SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Histolojik tanı ile SOX2 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,684) (**Tablo 14**).

Tablo 14: SOX2 (+) liği ile olguların tümör çapının dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

	SOX 2 (-)		SOX 2 (+)		P değeri
	n	%	n	%	
Histolojik tip					
Duktal	20	95,2	69	88,5	0,684
Lobüler	1	4,8	9	11,5	

Grade: SOX2 ekspresyonu; 58 grade II olgusunun 43'ünde (%55,1), 41 grade III olgusunun 35'inde (%44,9) saptanmış ancak olguların grade'leri ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (p=0,457) (**Tablo 15**).

Tablo 15: SOX2 (+) liği ile olguların gradelerinin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

	SOX 2 (-)		SOX 2 (+)		P değeri
	n	%	n	%	
Grade					
Grade 2	15	71,4	43	55,1	0,457
Grade 3	6	28,6	35	44,9	

Subtip: Luminal A olguların % 24,4'ünde (n=19), Luminal B olguların % 69,2'sinde (n=54), Her2 eksprese eden grubun % 6,4'ünde (n=5) SOX2 ile pozitif boyanma saptanmıştır. SOX2 ile subtipler arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p=0,018**) (**Tablo 16**).

Tablo 16: SOX2 (+) liği ile subtiplerin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

Subtip	SOX2 (+)		SOX2 (-)		P Değeri
	n	%	n	%	
Luminal A	19	24,4	6	28,6	0,018
Luminal B	54	69,2	10	47,6	
Her2 eksprese eden	5	6,4	3	14,3	
Bazal benzeri	0	0	2	9,5	

pT: TNM sistemindeki pT sınıflandırmasına göre tümör çapları gruplandırıldığında; tümör çapı küçük olan olguların SOX2 skorları daha düşük saptanmıştır. pT ile SOX2 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (**p=0,011**) (**Tablo 17**).

Tablo 17: SOX2 skorları ile pT'nin dağılım ve karşılaştırılma sonuçları

	Skor 0		Skor 1		Skor 2		Skor 3		P değeri
	n	%	n	%	n	%	n	%	
pT									
T1	11	52,4	13	44,8	6	20	8	42,1	0,011
T2	10	47,6	11	37,9	23	76,7	10	52,6	
T3	0	0	5	17,3	1	3,3	0	0	
T4	0	0	0	0	0	0	1	5,3	

Lenfovasküler invazyon: SOX2 (+) olan olguların 64'ünde (% 82,1) lenfovasküler invazyon mevcuttur. SOX2 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (**p=0,005**) (Tablo 18).

Tablo 18: SOX2 (+) liği ile lenfovasküler invazyonun dağılım ve karşılaştırma sonuçları

	SOX2 (-)		SOX2 (+)		p
	n	%	n	%	
LVİ*					
Yok	11	52,4	14	17,9	0,005
Var	10	47,6	64	82,1	

*lenfovasküler invazyon

Lenf nodu metastazı (pN): Nodal metastazı olan toplam 77 olgunun 67'sinde (% 85,9) SOX2 ekspresyonu mevcuttur. Lenf nodu metastazı ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (**p=0,038**) (Tablo 19).

Tablo 19: SOX2 (+) liği ile lenf nodu metastazının dağılım ve karşılaştırma sonuçları

	SOX2 (-)		SOX2 (+)		P değeri
	n	%	n	%	
Lenf Nodu Metastazı					
Yok	11	52,4	11	14,1	0,038
Var	10	47,6	67	85,9	

Uzak metastaz (M): Uzak metastazı olan toplam 18 olgunun 10'u (% 34,5) skor 1, 5'i (% 16,7) skor 2, 1'i (%5,3) skor 3 SOX2 pozitifliği göstermiş; 2 (% 9,5) olguda SOX2 ile boyanma görülmemiştir. Uzak metastaz varlığı ile immünohistokimyasal

SOX2 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir ($p=0,038$) (Tablo 20).

Tablo 20: SOX2 (+) liği ile uzak metastazın dağılım ve karşılaştırma sonuçları

	Skor 0		Skor 1		Skor 2		Skor 3		P değeri
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Uzak metastaz									
M1	2	9,5	10	34,5	5	16,7	1	5,3	0,038
M0	19	90,5	19	65,5	25	83,3	18	94,7	

Klinik Evre: SOX2 ekspresyonu; Evre I olguların 1'inde (% 1,3), Evre II olguların 32'sinde (% 41), Evre III olguların 29'unda (% 37,2) ve Evre IV olguların 16'sında (% 20,5) saptanmış, olguların klinik evreleri ile SOX2 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,015$). Erken evre 29 olgunun 18'inde (% 23,1), lokal ileri evre olguların 44'ünde (% 56,4) ve metastatik olguların 16'sında (% 20,5) SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Aralarındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,030$) (Tablo 21).

Tablo 21:SOX2 (+) liği ile olguların evrelerinin karşılaştırılması

	SOX2 (-)		SOX2 (+)		P değeri
EVRE					
Evre 1	5	23,8	1	1,3	0,015
Evre 2	10	47,6	32	41,0	
Evre 3	4	19,0	29	37,2	
Evre 4	2	9,5	16	20,5	
	SOX2 (-)		SOX2 (+)		P değeri
EVRE					
Erken evre	11	52,4	18	23,1	0,030
Lokal ileri evre	8	38,1	44	56,4	
Evre 4	2	9,5	16	20,5	

HR durumu ve proliferasyon indeksi: olguların ER, PR, Cerb B2 hormon reseptör durumları ile SOX2 ekspresyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir. (sırasıyla $p=0,275$, $p=0,788$, $p=0,159$). Ki 67 proliferasyon indeksi yüksek olan 70 olgunun 69'unda (% 88,5) SOX2 ekspresyonu pozitif bulunmuş, SOX2 ekspresyonu ile ki 67 proliferasyon indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,0001$) (Tablo 22).

Tablo 22: SOX2 (+)liği ile hormon reseptör durumu ve ki 67 indekslerinin karşılaştırılması

	SOX2 (-)		SOX2 (+)		P değeri
ER					
Negatif	3	14,3	9	11,5	0,275
Pozitif	18	85,7	69	88,5	
PR					
Negatif	6	28,6	23	29,5	0,788
Pozitif	15	71,4	55	70,5	
CerbB2					
Negatif	9	42,9	17	21,8	0,159
Pozitif	12	57,1	61	78,2	
Ki 67					
Düşük	20	95,2	9	11,5	0,0001
Yüksek	1	4,8	69	88,5	

RT-PCR ve immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilen SOX2 ekspresyonları karşılaştırılmış, $\Delta\Delta CT$ 'si negatif olan olguların % 95,2'si aynı zamanda immünohistokimyasal olarak da boyanma göstermemiştir. Yüksek SOX2 ekspresyonu olan olguların % 47,4'ü skor 3 boyanma göstermiştir. Hem sayısal hem de istatistiksel olarak $\Delta\Delta CT$ değerleri ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilen SOX2 skorlaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür (**p=0,0001**). (Tablo 23).

Tablo 23: SOX2 saptanmasında kullanılan RT-PCR ve İmmünohistokimya yöntemlerinin karşılaştırılması

	Skor 0		Skor 1		Skor 2		Skor 3		P değeri
	n	%	n	%	n	%	n	%	
$\Delta\Delta CT$*									
Negatif	20	95,2	0	0	0	0	1	5,2	0,0001
Düşük	0	0	27	93,1	25	83,3	9	47,4	
Yüksek	1	4,8	2	6,9	5	16,7	9	47,4	

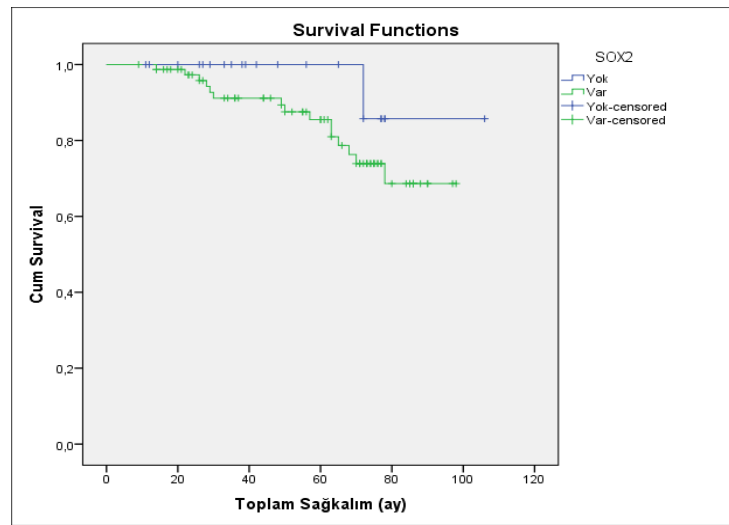
*RT-PCR ile elde edilen ekspresyon değeri.

SOX2 ekspresyonu ile hastaların remisyon, relaps, eks olma durumları karşılaştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmamıştır (p=0,322) (Tablo 24).

Tablo 24: SOX2 ile olguların durumlarının karşılaştırılması

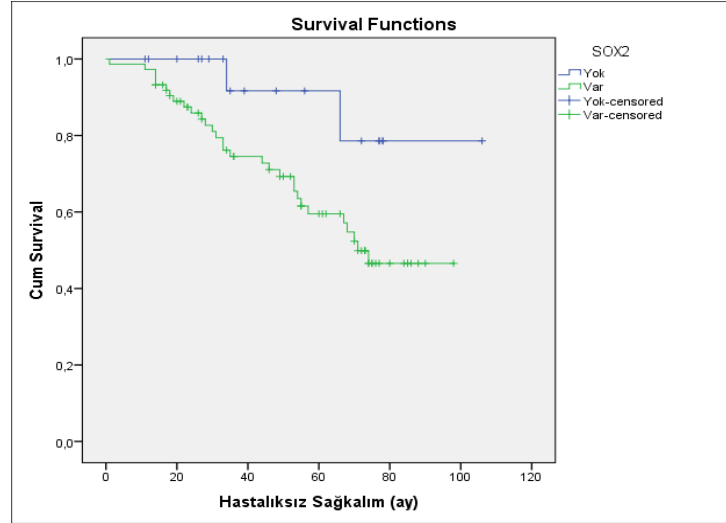
	SOX2 (-)		SOX2 (+)		P değeri
Son Durum					
Remisyon	16	76,2	44	56,4	0,322
Relaps	3	14,3	14	17,9	
Yaşıyor Hastalık Var	1	4,8	5	6,4	
Eks	1	4,8	15	19,2	

Genel Sağ Kalım (GSK): Kaplan Mayer analizi sonucunda SOX2 ekspresyonunun toplam sağ kalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür ($p=0.204$). SOX2 negatif olgularımız 101 ay yaşarken, SOX2 pozitif olgularımız 84,2 ay yaşam süresine sahiptir (**Şekil 6**).



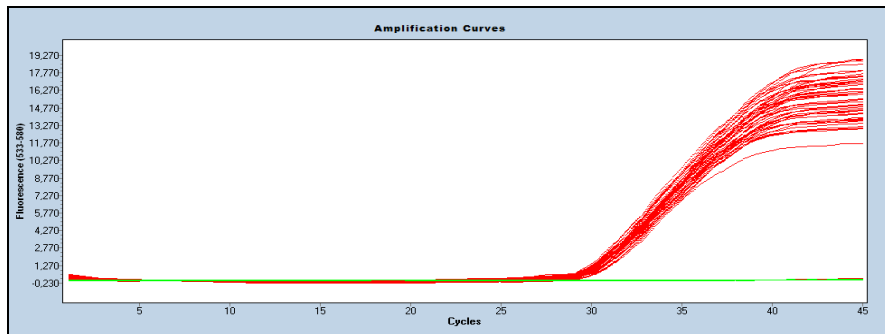
Şekil 6. SOX2 varlığının genel sağ kalım üzerine etkisi

Hastaliksız Sağ Kalım: Kaplan Mayer analizi sonucunda SOX2 ekspresyonunun hastaliksız sağ kalım üzerinde etkisi olduğu saptanmıştır. SOX2 ekspresyonu olan hastalar olmayanlara göre daha kısa hastaliksız yaşam süresine sahiptirler. Çalışmamızda SOX2 negatif olan olgularda hastaliksız yaşam süresi 94,7 ay iken, SOX2 pozitif olan olgularda bu süre 68,2 ay olarak belirlenmiştir ($p=0.049$) (**Şekil 7**).

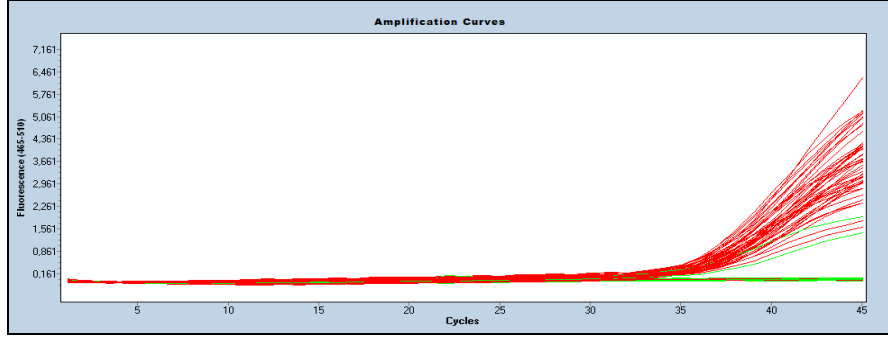


Şekil 7: SOX2 varlığının hastaliksız sağkalım üzerine etkisi

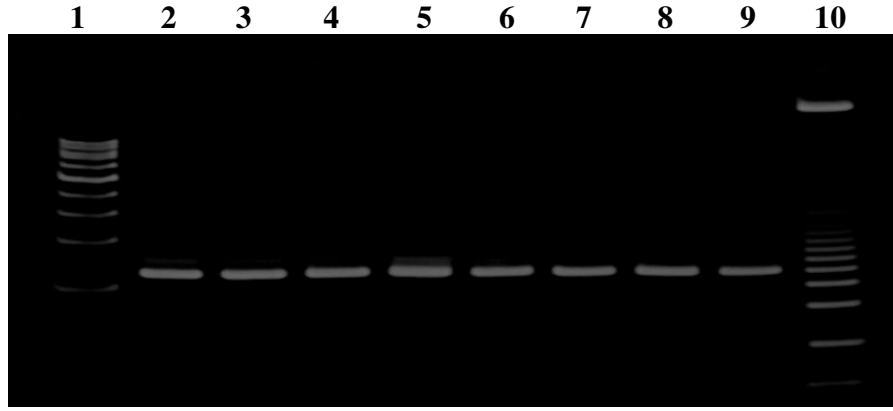
Çalışmamızda SOX2'yi saptamada immünohistokimyasal yöntem ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Bu iki yöntem arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde korelasyon katsayısı 0,734 bulunmuştur. Değişkenlerin güvenilirliği Cronbach's Alpha katsayısı ile değerlendirilmiş ve 1 olarak bulunmuştur (**p=0,0001**). Sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup, kullandığımız yöntemler arasında fark bulunmamıştır.



Şekil 8. RT-PCR ile β aktin (Referans gen) Amplifikasyon Eğrileri.

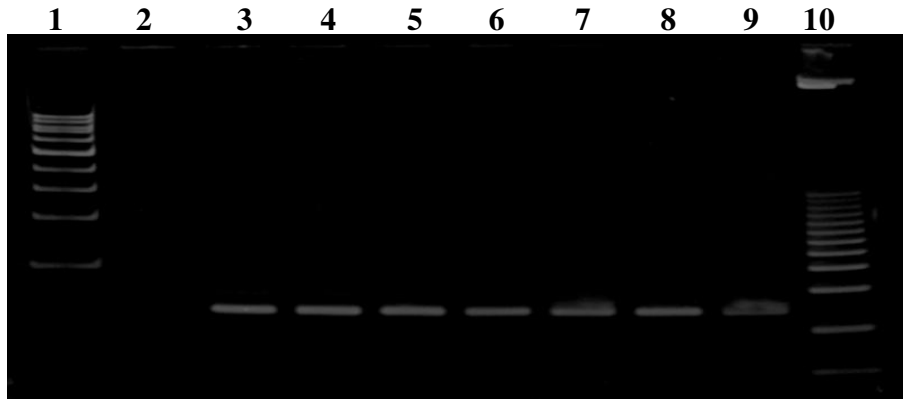


Şekil 9. RT-PCR ile SOX2 Gen ekspresyonunun Amplifikasyon Eğrileri.



Şekil 10. RT-PCR ile β aktin geninin 9:1 orandaki PAGE yürütülmesi

(1.Kuyu 100 bp'lik marker; 2. Kuyu pozitif kontrol; 3., 4., 5.,6., 7., 8.,9. Kuyular pozitif olgular, 10. Kuyu 25 bp'lik marker.)



Şekil 11. RT-PCR ile SOX2 gen ekspresyonu 9:1 orandaki PAGE yürütülmesi

(1. Kuyu 100 bp'lik marker, 2. Kuyu negatif kontrol, 3 Kuyu pozitif kontrol ,4., 5., 6., 7., 8., 9. Kuyular pozitif olgular, 10. Kuyu 25 bp'lik marker.)

5. TARTIŞMA

Meme karsinomu tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan malignitedir¹. Tanı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi amacıyla, gerek invaziv gerekse in situ meme karsinomlarında etyopatogeneze yönelik moleküler çalışmalar ivme kazanmış ve son yıllarda onkojenik özellik gösteren TF'ler üzerine yoğunlaşmıştır³⁻⁵.

Prognoz ve tedavi yönetimlerindeki farklılıklar açısından oldukça heterojen bir grup olan meme kanserleri kök hücreler bakımından zengindir^{101,102}. SOX2, *pluripotent* embriyonik kök hücrelerde kendi kendini yenilemeden sorumlu, geni 3p26.33 nolu kromozomda bulunan bir TF'dir⁶. Embriyolojik gelişimde, organogenezde ve çeşitli tip insan kanserlerinin tumorigenezinde rol oynadığı bildirilmektedir⁷⁻⁹. Meme dokusu ve kanserleri gelişimindeki rolü hakkındaki bilgiler son derece kısıtlıdır. Bu çalışmada invaziv karsinomlu meme olgularında immünohistokimya, RT-PCR yöntemlerini kullanılarak SOX2 ekspresyonu ve çeşitli prognostik klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda; normal meme dokusunda SOX2 ekspresyonu izlenmemiş, SOX2 ile meme dokusu gelişimi arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir^{11-13,85}. Kaynaklarla uyumlu olarak çalışmamızda yer alan normal meme olgularında da SOX2 ekspresyonu saptanmamıştır.

Meme karsinomlarında yapılan çalışmalarda SOX2 ekspresyon oranı geniş bir dağılım aralığı göstermektedir^{11-13,136}. Huang ve arkadaşlarının 552 invaziv karsinomlu olguyu içeren literatürde en geniş seri olan immünohistokimyasal çalışmalarında; 105 olguda (% 19) SOX2 ekspresyonu saptanmıştır¹¹. Nehad ve arkadaşlarının çalışmasında; immünohistokimyasal yöntemle 126 invaziv meme karsinomlu olgunun % 33,3'ünde, 19 duktal karsinoma in situ tanılı olgunun % 47,4'ünde ve 86 metastatik lenf nodunun % 54,7 oranında SOX2 pozitifliği bildirilmiştir¹³⁹. Leis ve arkadaşları; 158 invaziv meme karsinomlu olguyu içeren çalışma grubunda immünohistokimya, RT-PCR ve immünfloresan yöntemle SOX2 ekspresyon oranı % 30 olarak bulunmuştur¹³⁶. Lengerke ve arkadaşlarının, postmenapozal 95 invaziv meme karsinom olgusunun yer aldığı çalışmalarında hem immünohistokimyasal hem de RT-PCR yöntemleriyle % 28,

Rodriquez ve arkadaşlarının 226 olguluk immünohistokimyasal çalışmalarında ise % 16,7 oranında SOX2 ekspresyonu görülmüştür^{12,13}. Triple negatif invaziv meme karsinomlarını içeren bir çalışmada ise SOX2 ekspresyonu % 43,3 olarak bildirilmiştir¹³. Bizim 99 invaziv meme karsinomlu olgudan oluşan serimizde SOX2 ekspresyonu % 78,8 oranında bulunmuştur. Oranımız literatür verilerinin üstündedir. Bu, tedavi-takip süresine ulaşabildiğimiz seçilen olgu grubunun heterojen olması, belli bir popülasyonu temsil etmemesi ile açıklanabilir. Ayrıca olgularımızdaki SOX2 ekspresyon seviyesinin literatür olgularına göre daha geç dönemde başlaması, tespit-takip süresindeki farklılıklar yanı sıra tümörögenезis ve SOX2 ekspresyon yollarını etkileyen olgularımıza ait olası yöresel, genetik, moleküler farklılıkların da sonuca katkıda bulunduğu söylenebilir.

Tümör çapı ve TNM sınıflamasındaki pT değeri ile SOX2 varlığı arasında literatürde farklı sonuçlar mevcuttur. Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tümör çapı arttıkça SOX2 pozitifliğinin de arttığı saptanmıştır¹¹. Lengerke ve arkadaşlarının çalışmasında SOX2 ile büyük tümör çapı arasında ilişki görülmüş, Nehad ve arkadaşlarının serisinde tümör çapı ile SOX2 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmemiştir^{12,139}. Bizim çalışmamızda TNM sınıflamasındaki pT sistemine göre tümör çapları gruplandırıldığında; tümör çapı küçük olan olguların SOX2 skorları daha düşük bulunmuş, pT ile SOX2 skorları arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki saptanmıştır (**p=0,011**).

Çeşitli çalışmalarla^{66,71,77} belirlenen kriterlere göre meme karsinomları subtiplerine ayrılmıştır. Belirlenen subtipler ile SOX2 ekspresyon ilişkisi araştırılmıştır¹¹⁻¹³. Lengerke ve arkadaşlarının çalışmasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir¹². Rodriquez ve arkadaşlarının 226 olguyu içeren çalışmalarında bazal benzeri tipte 13 (% 43,3), Luminal tipte 14 (% 10,6), Her 2 eksprese eden tipte 2 (% 13,3) olguda SOX2 ekspresyonu görülmüş, subtipler ile SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Rodriquez ve arkadaşları çalışmalarında bazal benzeri histolojik subtipde daha yüksek oranda SOX2 varlığı saptanmış ve bu tipte SOX2 ekspresyonunun rolünün daha önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir¹³. Huang ve arkadaşları çalışmalarında SOX2 ekspresyonun en fazla Luminal B (% 22), en az Luminal A (% 13) subtipinde olduğunu bildirmişlerdir¹¹. Çalışmamızda en yüksek oranda SOX2 ekspresyonu Luminal B subtipinde (% 69,2) görülmüştür. Bunu %

23,1'lik bir oranla Luminal A subtipi takip etmektedir. Bulgularımız literatür ile uyumlu olup, Huang ve arkadaşlarının sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Bazal benzeri subtipde 2 olgumuz yer almakta olup, bu olgulardan 1'inde RT-PCR yöntemi ile SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Bu grupta yorum için daha fazla olgu sayısına gereksinim vardır. Sonuç olarak, çalışmamızda histolojik subtipler ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmış, genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım ile histolojik subtip arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Literatürdeki çalışmaların çoğunda tümörün histolojik grade'i ile SOX2 ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmuş, tümör hücresinde kötü farklılaşmaya bağlı olarak SOX2 ekspresyonun arttığına işaret edilmiştir^{11,85,139}. Lengerke, Rodriquez ve arkadaşlarının çalışmasında, histolojik grade ile SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır^{12,13}. Çalışmamızda yer alan grade II 58 olgunun 43'ünde (% 55,1), grade III 41 olgunun 35'inde (% 44,9) SOX2 ekspresyonu görülmüş, ancak histolojik grade ile SOX2 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,457). Bulgularımız Lengerke, Rodriquez ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte, serimizde grade I olgularının yer almayışı değerlendirmeyi etkilemiş olabilir.

SOX2 ile HR'leri (ER, PR, Cerb B2) ve ki 67 proliferasyon indeksi arasındaki ilişkiler literatürde farklı sonuçlarla bildirilmiştir¹¹⁻¹³. Postmenapozal meme karsinomlu 95 olgudan oluşan Lengerke ve arkadaşlarının çalışmasında; hormon reseptörleri ile SOX2 arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir¹². Rodriquez ve arkadaşlarının lenf nodu negatif meme karsinomlu hastalar üzerine yaptığı çalışmada hormon reseptörleri ile SOX2 arasında negatif ilişki gösterilmiştir¹³. Huang ve arkadaşlarının çalışmasında da ER ve PR ile SOX2 ekspresyonu arasında negatif bir korelasyon saptanmış, SOX2 arttıkça ER seviyesi azalmakta ve kötü prognozla ilişkili kök hücre sayısı artmaktadır sonucuna varılmıştır. ER ve/veya PR pozitif tümörlerin daha iyi prognozlu olmasından azaltılmış kanser kök hücre havuzu sorumlu tutulmuştur¹¹. Çalışmamızda hormon reseptörleri (ER, PR), Cerb B2 ve SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Huang¹¹ ve arkadaşlarının, Finicelli¹⁴⁰ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ki 67 proliferasyon indeksi yüksek olan olgularda SOX2 ekspresyon düzeyinin de yüksek olduğu görülmüştür. Rodriquez ve arkadaşlarının çalışmasında ise SOX2 ile ki 67

proliferasyon indeksi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır¹³. Bizim çalışmamızda yüksek ki 67 proliferasyon indeksi ile SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur (**p=0,0001**).

Lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz varlığı kötü prognoz açısından oldukça önemli faktörlerdir. Huang ve arkadaşlarının çalışmasında lenf nodu tutulumu ile SOX2 arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır¹¹. Nehad, Lengerke ve Rodriquez'in çalışmalarında lenf nodu tutulumu ile SOX2 ekspresyonu arasında korelasyon bildirilmiştir^{12,13,139}. Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada SOX2 aşırı ekspresyonu ile metastaz riskinin arttığından sözedilmektedir¹⁴¹. Stolzenburg ve arkadaşlarının çalışmalarında metastaz riski ile SOX2 ekspresyonu incelendiğinde; SOX2 yıkımı arttığında tümör hücre proliferasyonunun ve koloni formasyonunun azaldığı belirtilmiştir¹⁰⁵. Lengerke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; SOX2'nin meme karsinogenezisinde erken dönemde rol oynadığı ve yüksek ekspresyonunun metastatik potansiyeli arttırdığı gösterilmiştir¹². Bizim çalışmamızda da SOX2 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (**p<0,05**).

Kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülen SOX2'nin aşırı eksprese edildiği tümörlerde uzak metastaz, artmış Ki 67 proliferasyon indeksi ve aksiller lenf nodu tutulumu beklenen bir bulgudur. Çalışmamızda lenfovasküler invazyon, uzak metastaz gibi kötü prognostik faktörlerle yapılan Kaplan Mayer sağ kalım analizinde; bu parametrelerin genel sağ kalım süresini kısalttığı saptanmış (**p<0,05**), SOX2 ekspresyon düzeyi arttıkça lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı olasılığının arttığı da gösterilmiştir (sırasıyla **p=0,041**, **p=0,008**). Bulgularımız literatürle uyumlu olup, SOX2'nin kötü prognostik parametrelerle ilişkisini desteklemektedir.

Heterojen bir grup olan meme karsinomunun oluşması, rekürrensi ya da metastaz geliştirme riski arasında geçen süre; tedavi ve prognoz açısından önemli bir araştırma konusudur. Lu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme karsinomlarında teşhis anında metastazı olan olguları yaklaşık % 6-10 oranında bildirilmişler ve adjuvan kemoterapi ve primer tedavi alan hastalarda yaklaşık % 20-50'sinde metastaz geliştiğini saptamışlardır³⁴. Tanı anında metastazı olan olgu sayımız 18 'dir (% 18,2). Bu olguların 16'sında (% 20,5) SOX2 ekspresyonu görülmüş, istatistiksel olarak uzak metastaz ile SOX2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (**p=0,038**).

Leis ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Evre I olgularda % 57,9, Evre IIA olgularda % 26,3, Evre IIB olgularda % 10,5, Evre IIIA olgularda % 5,3 oranında SOX2 pozitifliği saptanmış, SOX2'nin tümörögenezisde erken dönemde etkili olduğu yorumu yapılmıştır¹³⁶. Lengerke ve arkadaşlarının çalışmasında DCIS olgularında invaziv karsinoma göre daha fazla ekspresyon saptaması da bu yorumu destekler niteliktedir^{12,136}. Çalışmamızda erken evre olan 29 olgunun 18'inde (% 23,1), lokal ileri evre olguların 44'ünde (% 56,4) ve metastatik olguların 16'sında (% 20,5) SOX2 ekspresyonu saptanmış ve aralarındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (**p=0,030**). Serimizde; Evre I olguların sayısının az olması ve pür DCIS olgularının yer almaması nedeniyle SOX2 ekspresyonu ile tümörögenezis süreci arasındaki ilişkinin net analizi yapılamamıştır.

Çalışmaya dahil edilen olgular prognozu belirlemek için relaps, rekürrens ve remisyon durumlarına göre sınıflandırılmışlardır. Finicelli ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada SOX2 seviyesi meme karsinomu için erken relapsta prognostik bir faktör olarak belirtilmiştir. SOX2 ekspresyonu arttıkça tümör rekürrens riski artmakta ve hastalıksız sağ kalım süresinin kısaltmakta olduğuna dikkat çekilmiştir¹⁴⁰. Bizim çalışmamızda olguların son durumları ve SOX2 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak relaps gözlenen 17 olgunun 14'ünde (% 17,9), eks olan 16 olgunun 15'inde (% 19,2) SOX2 ekspresyonu izlenmiştir. SOX2 pozitifliği olan olguların relaps yapma olasılıklarının sayısal olarak daha fazla oranda olduğu görülmüştür.

Sağ kalım analizleri ile SOX2 arasındaki ilişki incelendiğinde; Huang¹¹ ve arkadaşlarının çalışmasında SOX2 ekspresyonu arttıkça hastalıksız sağ kalım süresi kısaltmaktadır (p=0,012). Aynı çalışmada yüksek nodal evrelerde SOX2 bağımsız bir prognostik faktör olarak saptanmıştır (p=0,015). Finicelli ve arkadaşlarının çalışmasında SOX2 ile toplam sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmazken (p=0,104), aşırı SOX2 ekspresyonunun hastalıksız sağ kalım süresini kısalttığı görülmüştür (p=0,017). SOX2 ekspresyonu arttıkça tümör rekürrens riski artmakta ve hastalıksız sağ kalım süresi kısaltmaktadır sonucuna varılmıştır¹⁴⁰. Bizim çalışmamızda da Kaplan Mayer analizi sonucunda SOX2 ekspresyonu ile genel sağ kalım süresi arasında istatistiksel olarak bir ilişki olmadığı görülmüştür (p=0.204). SOX2 negatif olgularımız 101 ay yaşarken, SOX2 pozitif olgularımız 84,2 ay yaşam süresine sahiptir. SOX2 pozitifliği sayısal

olarak genel sağ kalım süresini kısaltmaktadır. SOX2 ekspresyonunun hastalıksız sağ kalım üzerinde etkisi araştırıldığında; SOX2 ekspresyonu olan olguların olmayanlara göre daha kısa hastalıksız yaşam süresine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda SOX2 negatif olan olgularda hastalıksız yaşam süresi 94,7 ay iken, SOX2 pozitif olan olgularda bu süre 68,2 olarak belirlenmiştir (**p=0.049**).

Finicelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SOX2'yi göstermede kullanılan immünohistokimya ve RT-PCR sonuçları korele bulunmuştur¹⁴⁰. Bizim çalışmamızda da her iki yöntemi karşılaştırdığımızda immünohistokimya ile RT-PCR arasında anlamlı ilişki mevcuttur. Korelasyon testlerinde elde edilen sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup kullandığımız yöntemlerin birbirine üstünlüğü bulunmamıştır.

Çalışmamızda meme karsinomlarında kanser kök hücre belirleyicilerinden biri olan SOX2 ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırılmış ve bunun sonucunda bazı kötü prognostik faktörlerle SOX2 ekspresyonu arasında ilişki bulunmuştur. Bu ilişki gelecekte meme kanserinde hedefe yönelik alternatif tedaviler için yol gösterici olacak, tedavide SOX2'den yararlanılması ile yeni tedavi olanaklarına ışık tutacaktır. Bunun için geniş serilerle ve klinik tedavi basamaklarını da içine alan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR:

1. Çalışmamız 99 olgudan oluşmaktadır.
2. Olguların tamamı kadın olup, ortalama yaş 52,7'dir (23-83).
3. Olguların 47'si (% 47,5) invaziv duktal karsinom, 8'i (% 8,1) invaziv lobüler karsinom, 42'si (% 42,4) invaziv duktal karsinom+ in situ duktal karsinom, 2'si (% 2) invaziv lobüler karsinom+ in situ lobüler karsinom tanısı almıştır.
4. SOX2 ekspresyon değerlendirilmesi için immünohistokimya ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır.
5. Normal meme dokusuna sahip kontrol grubundaki olguların tamamında hem immünohistokimyasal olarak hem de RT-PCR yöntemiyle SOX2 ekspresyonu görülmemiştir. Sonuç literatürle uyumludur.
6. İmmünohistokimyasal yöntemle 78 olguda SOX2 ile pozitif boyanma saptanmış, 29 olgu (% 29,3) skor 1, 30 olgu (% 30,3) skor 2, 19 olgu (% 19,2) skor 3 olarak değerlendirilmiştir. 21 olguda SOX2 ile (% 21,2) boyanma izlenmemiştir.
7. RT-PCR yöntemiyle 78 olguda (% 78,8) SOX2 ekspresyonu saptanmış, 21 olguda (% 21,2) ekspresyon görülmemiştir. $\Delta\Delta CT$ değerlerine göre; 17 olguda (% 17,2) yüksek, 61 olguda (% 61,6) düşük ekspresyon mevcuttur.
8. Çalışmamızda saptanan SOX2 ekspresyon oranı literatür verilerinin üstündedir. Bu, tedavi-takip süresine ulaşabildiğimiz seçilen olgu grubunun heterojen olması, belli bir popülasyonu temsil etmemesi ile açıklanmıştır. Ayrıca olgularımızdaki SOX2 ekspresyon seviyesinin literatür olgularına göre daha geç dönemde başlaması, tespit-takip süresindeki farklılıklar yanı sıra tümörögenезis ve SOX2 ekspresyon yollarını etkileyen olgularımıza ait olası yöresel, genetik, moleküler farklılıkların da sonuca katkıda bulunduğu söylenebilir.
9. En küçük tümör çapı 1 cm, en büyük çap ise 8,3 cm olup, ortalama çap 2,4 cm'dir. Tümör çapı büyük olan olguların SOX2 skorlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. pT ile SOX2 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür (**p=0,011**).

10. Luminal A olguların % 24,4'ünde, Luminal B olguların % 69,2'sinde SOX2 pozitifliği izlenmiştir. Subtipler ve SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur (**p=0,018**).
11. SOX2 ekspresyonu; Luminal A subtipinde, Luminal B tipine göre daha az oranda saptanmıştır. Bulgularımız literatürle uyumlu bulunmuştur.
12. Bazal benzeri subtip 2 olgumuz yer almakta olup, bu olgulardan 1'inde RT-PCR yöntemi ile SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Bu grupta yorum için daha fazla olgu sayısına gereksinim vardır.
13. Çalışmamızda histolojik subtipler ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmış, genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım ile histolojik subtip arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.
14. Olguların 58'i (% 58,6) Grade II, 41'i (% 41,4) Grade III'dür. Grade II olguların 43'ünde (% 55,1), Grade III olguların 35'inde (% 44,9) SOX2 ekspresyonu saptanmış. Grade ile SOX2 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (**p=0,457**).
15. SOX2 (+) olan olguların 64'ünde (% 82,1) lenfovasküler invazyon da mevcuttur. Lenfovasküler invazyon ile SOX2 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmuştur (**p=0,005**).
16. Lenf nodu metastazı olan toplam 77 olgunun 67'sinde (% 85,9) SOX2 ekspresyonu görülmüştür. Lenf nodu metastazı ile SOX2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (**p=0,038**).
17. Toplam 18 olgumuzda (% 18,2) uzak metastaz mevcuttur. SOX2 ekspresyonu olan olguların uzak metastaz yapma riskinin arttığı gözlemlenmiştir. SOX2 pozitifliği ile uzak metastaz varlığı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (**p=0,038**).
18. Erken evre olan 29 olgunun 18'inde (% 23,1), lokal ileri evre olguların 44'ünde (% 56,4) ve metastatik olguların 16'sında (% 20,5) SOX2 ekspresyonu saptanmış ve aralarındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (**p=0,030**).
19. Ki 67 proliferasyon indeksi yüksek olan olgularda SOX2 ekspresyonu da yüksek bulunmuştur. Aralarındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (**p=0,0001**).

20. Olgularımızın takip süreleri en az 9,5 ay, en fazla 123,7 ay olup; ortalama 57,6 aydır. SOX2 ekspresyonu ile hastaların remisyon, relaps, eks olma durumları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p=0,322$).
21. SOX2 (-) olan olguların yaşam süresi $101,1\pm4,5$ ay iken, SOX2 (+) olan olguların yaşam süresi $84,2\pm3,1$ ay olduğu gözlemlenmiştir. SOX2 pozitifliği ile GSK arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.204$). SOX2 ile GSK arasındaki sayısal olarak anlamlı görünen ilişkinin istatistiksel açıdan anlamsız olması olgu sayısının azlığına bağlanmıştır.
22. SOX2 ekspresyonu olan olgularda HSK süresinin, ekspresyonu olmayan olgulara göre daha kısa olduğu görülmüştür. Aralarındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.049$).
23. SOX2 ekspresyonu ile olguların yaşı, histolojik tipi ve hormon reseptör durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.
24. Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntem ile RT-PCR sonuçları birbirine paraleldir. Her iki yöntemin birbirine üstünlüğü bulunamamıştır. SOX2 ekspresyonunu saptamada her iki yöntem de kullanılabilir.
25. Meme karsinomlarında SOX2 ile klinik parametrelerin karşılaştırıldığı çalışmalar az sayıdadır. Sonuçlarımız literatürdeki verileri genişletecek ve bu konudaki araştırmalara ışık tutacaktır.
26. Çalışmamızda meme karsinomlarında kanser kök hücre belirleyicilerinden biri olan SOX2 ekspresyonu ile kötü prognostik faktörler arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu ilişki gelecekte meme kanserinde hedefe yönelik alternatif tedaviler için yol gösterici olacaktır.
27. Bu konuda geniş serilerle ve klinik tedavi basamaklarını da içine alan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer statistics, **2012**. CA Cancer J Clin 2012; 62:10-29.
2. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı-Türkiye kanser istatistikleri, belgeler **2008**.
3. **Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A **2003**; 100:3983-8.
4. **Campbell LL, Polyak K.** Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? Cell Cycle **2007**; 6:2332-8.
5. **Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, et al.** Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. Carcinogenesis **2011**; 32:650-8.
6. **Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H.** Pairing SOX off: with partners in the regulation embryonic development. Trends Genet. **2000**; 16; 182-187.
7. **Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D et al.** Sox 2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult Mouse brain. Development **2004**; 131; 3805-3819.
8. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell **2007**; 131; 861-872.
9. **Yu J, Vodyanik MA, Simuga-Otto K et al.** Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells. Science **2007**; 318; 1917-1920.
10. **Graham V, Khudiyakow J, Ellis P, Pevny L.** SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron **2003**; 39; 749-765.
11. **Huang Y, Luo M, Ni Y;** Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases, Histopathology **2014**, 64, 494–503.
12. **Lengerke C, Fehm T, Kurth R et al.** Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. BMC Cancer **2011**; 11; 42.
13. **Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G et al.** SOX2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. Mod. Pathol. **2007**; 20; 474–481.
14. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, eds.** GLOBOCAN **2008** v1.2, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10, Lyon France: International Agency for Research on Cancer.

15. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Estimating the world cancer burden. Globocan **2000**. Int J Cancer **2001**;94: 153-156.
16. **Tavassoli A, Devilee P.** World Health Organisation Classification of Tumours, Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC pres; **2012**.
17. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures: **2011**.
18. **Erhan Y, Canda T.** Meme Hastalıkları Patolojisi ve Meme Kanseri. Mocan Kuzey G (editor). Temel Patoloji. Ankara: Günes Kitabevi, **2007**; 22: 705-739.
19. **Rosai J.** Breast. Rosai J (editor). Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Mosby Edinburg, **2004**; 20: 1763-1877.
20. **Kumar V,** Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease-8th ed. Philadelphia: **2010**.
21. **Reeves GK, Prie K, Green J, Bull D, Beral V (2009).** Reproductive factors and spesific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. Br J Cancer 100: 538-544.
22. **Tavassoli A,** Pathology Of The Breast-2nd ed. Stamford, Connecticut: **1999**.
23. **Loof-Johanson M, Brudin L, Sundquist M, Thorstenson S, Rudebeck CE (2010).** Breastfeeding and prognostic markers in breast cancer. Breast 20:170-175.
24. **Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE (2006).** Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. J Natl Cancer Inst 98: 1406-1415.
25. **Tworoger SS, Hankinson SE (2008).** Prolactin and breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. J Mammary Gland Biol Neoplasia 13:41-53.
26. **Rehnan AG, Harvie M, Howell A (2006)** Insulin-like growth factor (IGF)-1, IGFbinding protein-3, and breast cancer risk: eight years on. Endocr Relat Cancer 13: 273-278.
27. **Bernstein L (2002).** Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 7: 3-15.
28. **Boecker W,** Preneoplasia Of The Breast-a New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease. Elsevier: **2006**.
29. **Lester SC. The Breast. Kumar V, Abbas A, Fausto N (editors).** Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Philadelphia, **2005**: 1120-1149.

30. **Rich- Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE (1994).** Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 171: 171-177.
31. **Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, et al.** Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res.* **2008** Jan 15;14(2):370-8.
32. **Hu Z, Fan C, Oh DS, et al.** The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **2006**; 7:96.
33. **Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, et al.** Cancer stem cells— old concepts, new insights. *Cell Death Differ* **2008**; 15:947-58.
34. **Lu J, Steeg P.S., Price J.E., Krishnamurthy S., Mani S.A., Reuben J., Cristofanilli M., Dontu G., Bidaut L., Valero V., Hortobagyi G.N.Yu D.** Breast cancer metastasis: challenges and opportunities. *Cancer Res.* **2009**; 69, 4951-4953.
35. **Yager JD, Davidson NE.** Carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* **2006** Jan 19;354(3):270-82.
36. **Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al.** Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* **2009**; 138:645-59.
37. **Kai K, Arima Y, Kamiya T, et al.** Breast cancer stem cells. *Breast Cancer* **2010**; 17:80-5.
38. **Cobaleda C, Cruz JJ, González-Sarmiento R, et al.** The emerging picture of human breast cancer as a stem cell-based disease. *Stem. Cell Res* **2008**; 4:67-79.
39. **Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al.** In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes* **2003**; 17:1253-70.
40. **Dontu G, Wicha MS.** Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2005**; 10:75-86.
41. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**; 414:105-11.
42. **Vorechovský I, Benediktsson KP, Toftgård R.** The patched/hedgehog/smoothened signalling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. *Eur J Cancer* **1999**; 35:711-3.
43. **Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, et al.** Expression of an activated Notch4 (int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro. *Int J Cancer* **2000**; 86:652-9.

44. American Joint Committee On Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual 7th. Ed. **Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III H. Eds.** New York: Springer. **2009**.
45. **Sant M, Allemani C, Berrino F, et al.** Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer* **2004** Feb 15; 100(4): 715-22.
46. International Union against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumors 7th ed. **Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch.eds.** Wiley- Blackwell. Oxford. **2009**.
47. **Page DL.** Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* **1991** Apr; 15(4): 334-49.
48. **Rosen PP.** Invasive Duct Carcinoma: Assesment of Prognosis, Morphologic Prognostic Markers and Tumor Growth Rate. In: Rosen's Breast Pathology. Thirddedition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2009**;358–394.
49. **Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Gerau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V et al.** Invasive Breast Carcinoma. In: Tavassoli FA, Devielee P (eds). Tumours of the Breast and Female Genital Organs, WHO Classification. Lyon: IARC Pres, **2003**;11–59.
50. **Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW.** Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* **2004**;100(1):20–7.
51. **Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al.** Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement **1999**. Arch Pathol Lab Med. 2000;124(7):966-978.
52. **Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, Morrow M.**Presenting Features of Breast Cancer Differ by Molecular Subtype. *Ann Surg Oncol* **2009**.
53. **Elston CW, Ellis IO** Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **1991**;19:403-10.
54. **Pinder SE, Murray S, Ellis IO, et al.** The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*. **1998**;83(8):1529-1539.
55. **Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC.** Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* **1999** May; 17(5): 1474-81.
56. **Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN.** The HER2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER2 therapy and personalized medicine. *The oncologist* **2008**;14: 320–68.

57. **Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al.** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* **2007** Jan 1; 25(1): 118-45.
58. **Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW.** An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2008** Feb; 107(3): 309-30.
59. **Özdemir D, Pak I.** C-erbB-2 Skor 2 Olan Meme Karsinomlarında HER2 Amplifikasyonu ve Prognostik Etkinliği. *Türk Patoloji Dergisi* **2010**;26:140–146.
60. **Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**;98(19):10869–74.
61. **Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **2002**; 415: 530–536.
62. **Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al.** Gene expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* **2001**; 344: 539-548.
63. **West M, Blanchette C, Dressman H, et al.** Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98: 11462-11467.
64. **Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Borresen- Dale AL, Botstein D.** Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**;100(14):8418–23.
65. **Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G.** Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol* **2006**;37(9):1217–26.
66. **Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO.** Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* **2008**;14(5):1368–76.
67. **Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F.** p63, cytokeratin 5, and Pcadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* **2005**;447(4):688–94.
68. **Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C.** Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* **2003**;12(1):27–34.

69. **Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C.** Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* **2005**; 23: 7350- 7360.
70. **Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, et al.** Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* **2008**; 216: 141–150.
71. **Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM.** Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* **2004**;10(16):5367–74.
72. **Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM.** Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* **2006**;19(2):264–71.
73. **Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, et al.** p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* **2005**; 47: 458-466.
74. **Hannemann J, Kristel P, van Tinteren H, et al.** Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase IIa: predictive role indose intensive adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2006; 95: 1334– 1341. Epub **2006** Oct 31.
75. **Ihemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, Adams-Campbell L, Frederick WA.** Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res* **2007**;143(1):109–18.
76. **Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO.** Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* **2004**;203(2):661–71.
77. **Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC.** Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* **2006**;295(21):2492–502.
78. **Zhao J, Liu H, Wang M, Gu L, Guo X, Gu F, Fu L.** Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. *J Surg Oncol* **2009**;100(2):89–94.
79. **Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA.** Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **2003**;95(19):1482–5.
80. **Darnell J.E. Jr (2002)** Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 740–749.

81. **Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P:** The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mamm Genome* **1994**, 5:640–642.
82. **Dong C, Wilhelm D, Koopman P:** Sox genes and cancer. *Cytogenetic and Genome Research* **2004**, 105:442–447.
83. **Takahashi K & Yamanaka S (2006):** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
84. **Boyer LA, Lee TI, Cole MF et al. (2005).** Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122 (6): 947–56.
85. **Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y:** The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* **2008**, 283:17969–17978.
86. **Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJA:** The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5:899–904.
87. **Hanahan D, Weinberg RA:** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144:646–674.
88. **Weina K., Utikal J,** SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic, **Weina and Utikal Clinical and Translational Medicine** **2014**, 3:19.
89. **Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R:** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **2003**, 17:126–140.
90. **Ye X., Wu F.,Wu C,Wang P.** β -catenin, a SOX2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of SOX2 in breast cancer cells.
91. **Li, X. L., Eishi, Y., Bai, Y. Q., Sakai, H., Akiyama, Y., Tani, M., Takizawa, T., Koike, M., and Yuasa, Y.** Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in humangastric carcinoma. *International Journal of Oncology* **(2004)** *Int. J. Oncol.* 24, 257–263.
92. **Sattler, H. P., Lensch, R., Rohde, V., Zimmer, E., Meese, E., Bonkhoff, H., Retz, M., Zwergel, T., Bex, A., Stoeckle, M., and Wullich, B. (2000)** *Prostate* 45, 207–215.
93. **Gure, A. O., Stockert, E., Scanlan, M. J., Keresztes, R. S., Jager, D., Altorki, N. K., Old, L. J., and Chen, Y. T. (2000)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4198–4203.
94. **Comtesse, N., Zippel, A., Walle, S., Monz, D., Backes, C., Fischer, U., Mayer, J., Ludwig, N., Hildebrandt, A., Keller, A., Steudel, W. I., Lenhof, H. P., and Meese, E. (2005)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9601–9606.

95. **Sanada, Y., Yoshida, K., Ohara, M., Oeda, M., Konishi, K., and Tsutani, Y. (2006)** *Pancreas* 32, 164–170.
96. **Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu SY, Perner S, Verhaak RG, et al:** SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophagealsquamous cell carcinomas. *Nature Genetics* **2009**, 41:1238-U105.
97. **Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E, du Manoir S:** SOX2 Is an Oncogene Activated by Recurrent 3q26.3 Amplifications in Human Lung Squamous Cell Carcinomas. *Plos One* **2010**.
98. **Maier S, Wilbertz T, Braun M et al.** SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Hum. Pathol.* **2011**; 42; 1078–1088.
99. **Neumann J, Bahr F, Horst D et al.** SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer* **2011**; 11; 518.
100. **Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N et al.** EGFR/SRC/AKT signaling modulates SOX2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2012**; 11; 73.
101. **Perou,C.M, Sorlie,T., Eisen,M.B., van de Rijn,M., Jeffrey,S.S., Rees,C.A., Pollack,J.R., Ross,D.T., Johnsen,H., Akslen,L.A. et al. (2000).** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752.
102. **Prat,A., Parker,J.S., Karginova,O., Fan,C., Livasy,C., Herschkowitz,J.I., He,X. and Perou,C.M. (2010)** Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res., BCR*, 12, R68.
103. **Ben-Porath,I., Thomson,M.W., Carey,V.J., Ge,R., Bell,G.W., Regev,A. and Weinberg,R.A. (2008)** An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat.Genet.*, 40, 499–507.
104. **Beltran,A.S., Rivenbark,A.G., Richardson,B.T., Yuan,X., Quian,H., Hunt,J.P., Zimmerman,E., Graves,L.M. and Blancafort,P. (2011)** Generation of tumor initiating cells by exogenous delivery of OCT4 Transcription Factor. *Breast Cancer Research: BCR*, 13, R94.
105. **Stolzenburg S. G.Rots M.,S.Beltran A. ,**Targeted silencing of the oncogenic transcription factor Sox2 in breast cancer *Nucleic Acids Research*, **2012**, 1–16.
106. **Guarino M, Rubino B, Ballabio G:** The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* **2007**, 39(3):305–318.
107. **Thiery JP:** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2(6):442–454.

108. **Bastid J:** EMT in carcinoma progression and dissemination: facts, unanswered questions and clinical considerations. *Cancer Metastasis Rev* **2012**, 31(1–2):277–283.
109. **Kalluri R, Weinberg RA:** The basics of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Invest* **2009**, 119(6):1420–1428.
110. **Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, et al.** The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial–mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* **2005**;206:451–457.
111. **Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, Hood L, Yuan Y, Lin B:** Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One* **2012**, 7(8):e41335.
112. **Wu F., Ye X., Wang P., Jung K. et all.** Sox2 suppresses the invasiveness of breast cancer cells via a mechanism that is dependent on Twist1 and the status of Sox2 transcription activity, *BMC Cancer* **2013**, 13:317.
113. **Piva M, Domenici G, Iriondo O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, Barredo I, López-Ruiz JA, Zabalza I, Kypta R, Vivanco MM:** Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med* **2014**, 6(1):66–79.
114. **Favaro R, Appolloni I, Pellegatta S, Sanga AB, Pagella P, Gambini E, Pisati F, Ottolenghi S, Foti M, Finocchiaro G, Malatesta P, Nicolis SK:** Sox2 is required to maintain cancer stem cells in a mouse model of high-grade oligodendroglioma. *Cancer Res* **2014**, 74:1833–1844.
115. **Dogan I, Kawabata S, Bergbower E, Gills JJ, Ekmekci A, Wilson W, Rudin CM, Dennis PA:** SOX2 expression is an early event in a murine model of EGFR mutant lung cancer and promotes proliferation of a subset of EGFR mutant lung adenocarcinoma cell lines. *Lung Cancer* **2014**, 85(1):1–6.
116. **Rusness HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL.** Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest.* **2011**;121(10):3810-3818.
117. **Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al.** The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumors reveals novel subgroups. *Nature* **2012**;486:346-352.
118. **Anonim,** *Science*,**1985**:230,1350.
119. **Kubista, M., Andrade M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al.** The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* **2006**;27:95-125.
120. **J.M., Bengtsson.; Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, XT., Chuang M.Y.** Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) . *The Journal of American Science*, 2(3), **2006**.

121. **Dorak, M.T.** Real-time PCR. School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, UK. ISBN 0–203–96731–3 Master e-book ISBN, **(2006)**, 39 –62.
122. **Anonim.** BIORAD - Amplification Tech Notes and Posters.
123. **Oral, H.B.** Enfeksiyon Hastalıkları ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu. nj.O.T.F. Enfeksiyon II. Kliniği, TKlin Tıp Bilimleri **1992**, 12, BURSA.
124. **Gut, M., Leutenegger, C.M., Huder, JB., Pedersen, N.C., Lutz, H.** One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. J Virol Methods **1999**;77:37-46.
125. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
126. **Arı, S.Temizkan, G.Arda, N.,**Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, “DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması” ,Nobel Kitabevi, 57-67, **(1999)**.
127. **Anonim.** <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
128. **Anonim.** Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Applied Biosystems.
129. **Anonim.** Real Time PCR. <http://www.iontek.com.tr/?id=11.42>. DNA/RNA Real-Time Quantitative PCR.
130. **Günel, T.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. Türkiye Klinikleri J Med Sci **2007**, 27:763-767.
131. **Anonim.** Real-Time PCR Applications Critical Factors for Successful Real-Time. Qiagen PCR Hand Book.
132. **Leutenegger, C. M.** The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Medicine.
133. **Valasek, M. A. and Repa1, Joyce J.** The power of real-time PCR Adv Physiol Educ 29: 151–159, **2005**.
134. **Ma, H, Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, XT., Chuang M.Y.** Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) . The Journal of American Science, 2(3),**(2006)**.
135. **Mulema, J.M.K.** Analysis of data from Real time experiments.ppt. **(2006)**.
136. **Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, et al.** Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. Oncogene **2012**; 31:1354-65.

137. **Justilien V, Walsh MP, Ali SA, Thompson EA, Murray NR, Fields AP:** The PRKCI and SOX2 oncogenes are coamplified and cooperate to activate Hedgehog signaling in lung squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* **2014**, 25:139–151.

138. **Lin F, Lin P, Zhao D, Chen Y, Xiao L, Qin W, Li D, Chen H, Zhao B, Zou H, Zheng X, Yu X:** Sox2 targets cyclinE, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif* **2012**, 45:207–216.

139. **Nehad. M. R., Abd El-Maqsoud, & Abd El-Rehim, D. M. (2014).** Clinicopathologic implications of EpCAM and Sox2 expression in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 14(1).

140. **Finicelli M., Giovanni B., Squillaro T.** Expression of stemness genes in primary breast cancer tissues: the role of SOX2 as a prognostic marker for detection of early recurrence. **2014**, *Oncotarget*, Vol 5, No.20.

141. **Li X, Xu Y, Chen Y, Chen S, Jia X, Sun T, Liu Y, Li X, Xiang R, Li N.** SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ β -catenin signal network. *Cancer Lett.* **2013**; 336(2):379-89.

142. **Gangopadhyay, S., Nandy, A., Hor, P., & Mukhopadhyay, A. (2013).** Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clinical Breast Cancer*.

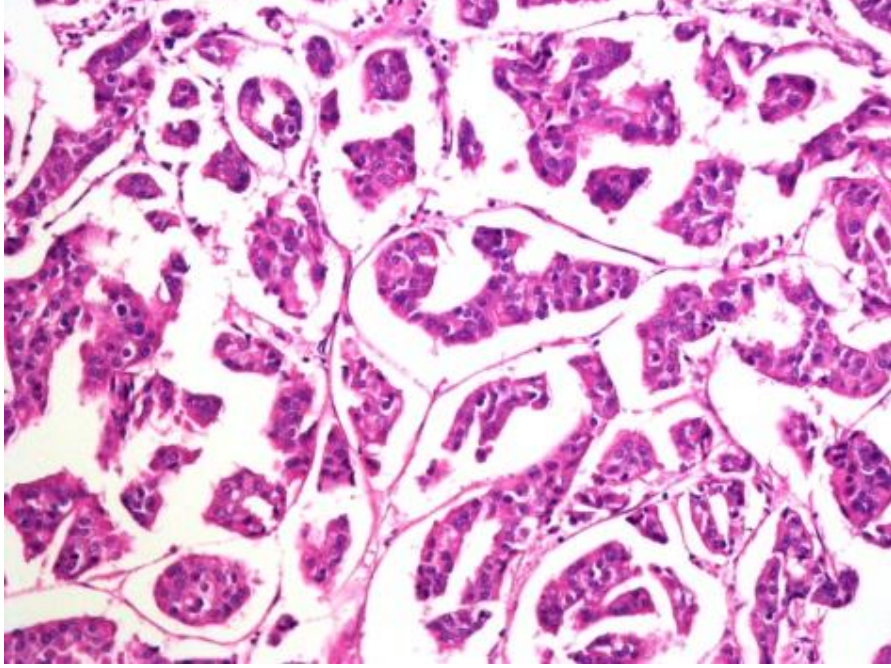
143. **K. Liu et al. / Cellular Signalling** 25 (2013) 1264–1271.

ÖZGEÇMİŞ:

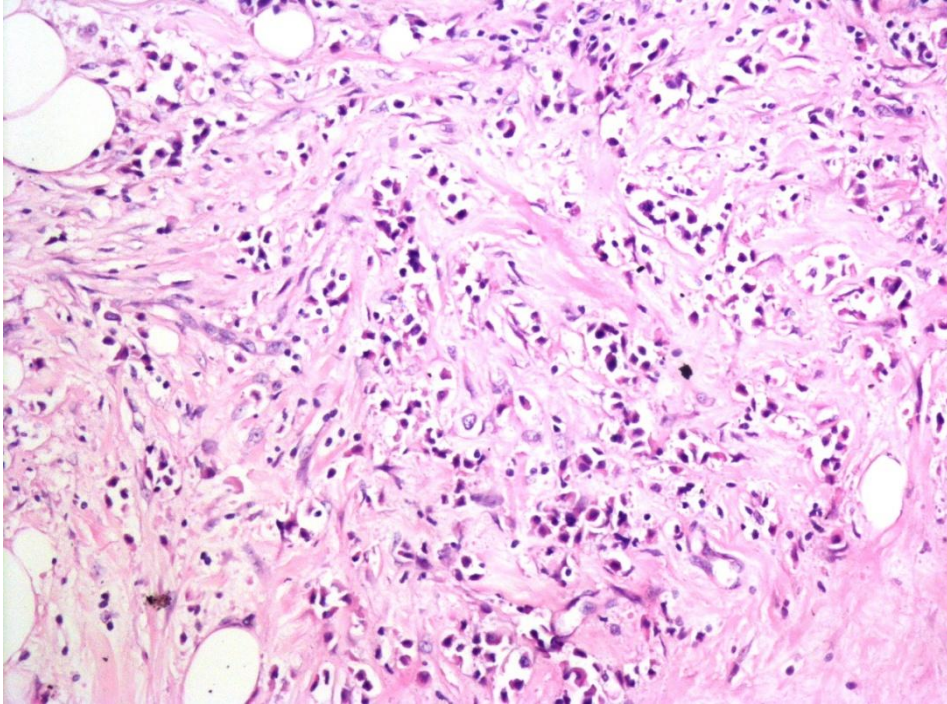
Adı Soyadı : Zeynep Ruken Şaman
Doğum Tarih ve Yeri : 18/05/1985, Sarıoğlu
Medeni Durumu : Bekar
Adres : ÇÜTF Patoloji A.D Sarıçam/Adana
Telefon : 0322 338 60 60
E. posta : zeynep_smn@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yerleri: 2009-2010: Gaziantep Cemile Abdullah Kiraz
Sağlık Ocağı
2010- 2011: Şehitkamil Toplum Sağlığı Merkezi
Dernek Üyelikleri : Çukurova Patoloji Derneği
Yabancı Dil : İngilizce

EKLER

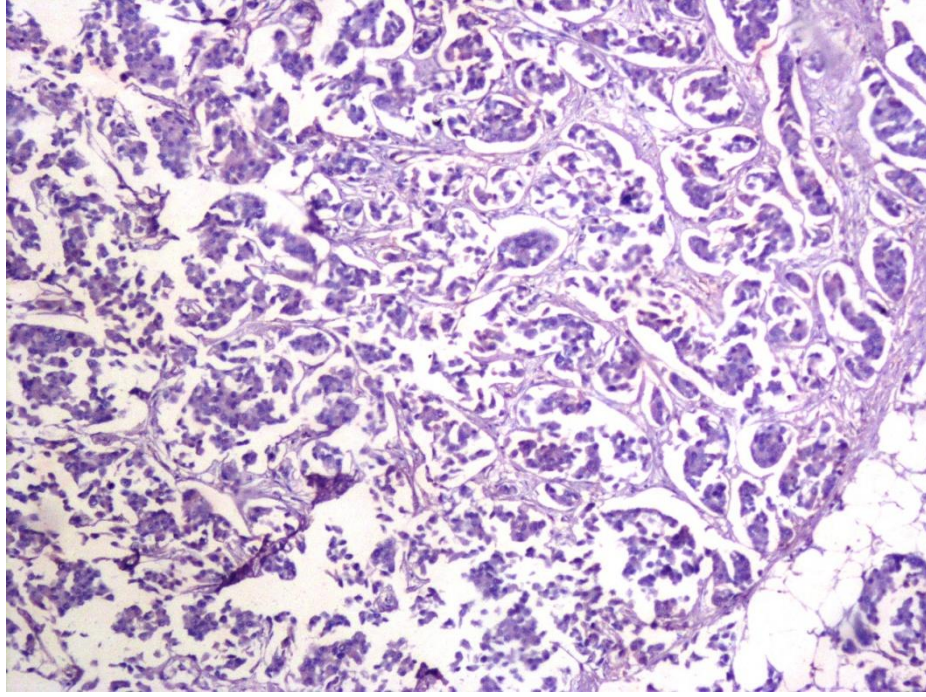
Ek-1. Resimler



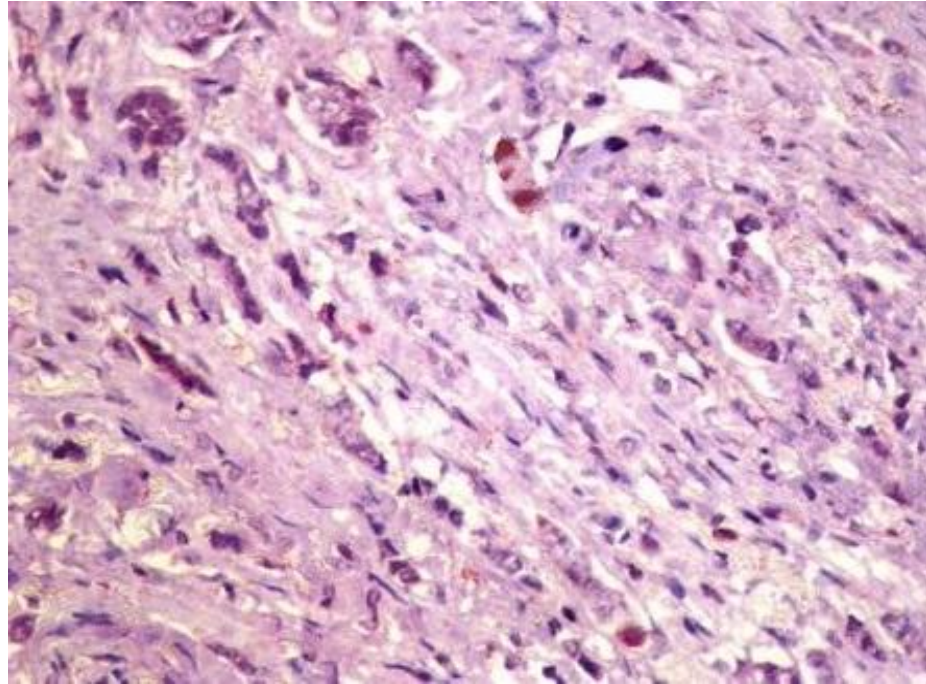
Resim 1. İnvaziv Duktal Karsinom H&E x200.



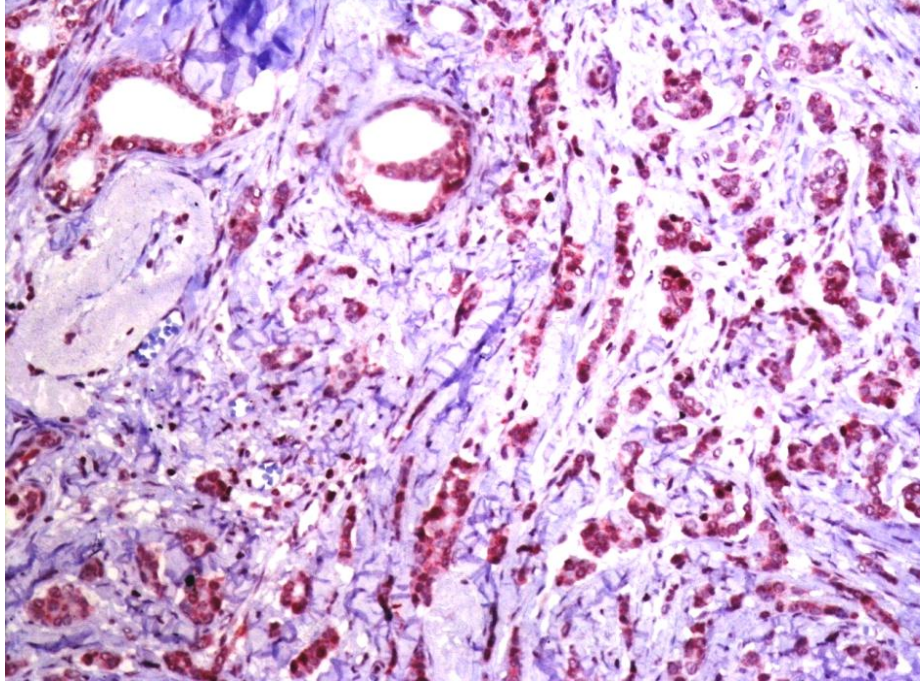
Resim 2. İnvaziv Lobüler Karsinom H&E x100.



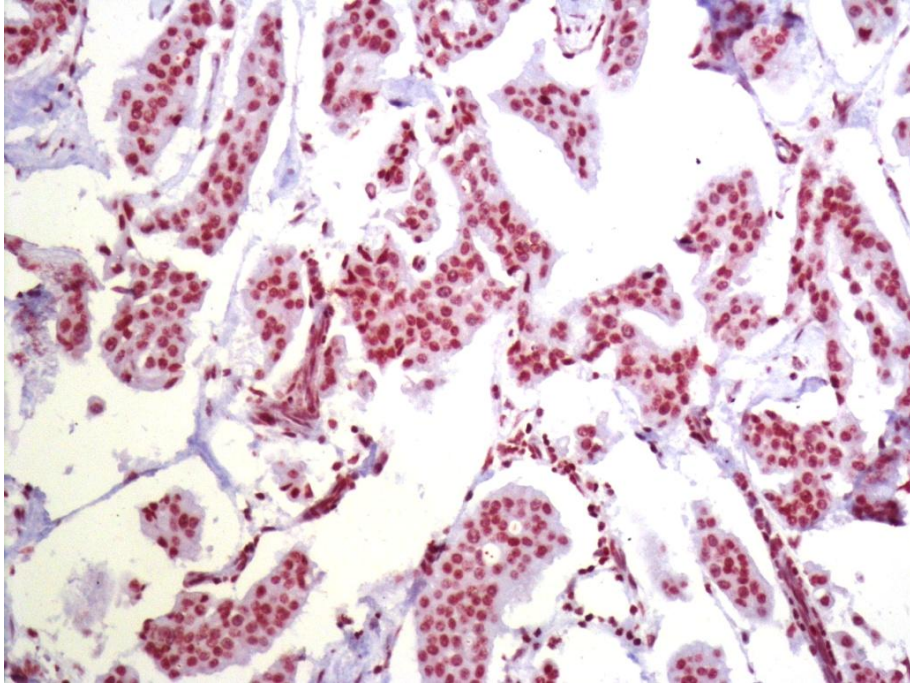
Resim 3. İhk ile SOX2 negatif (Skor 0) boyanma. (X100)



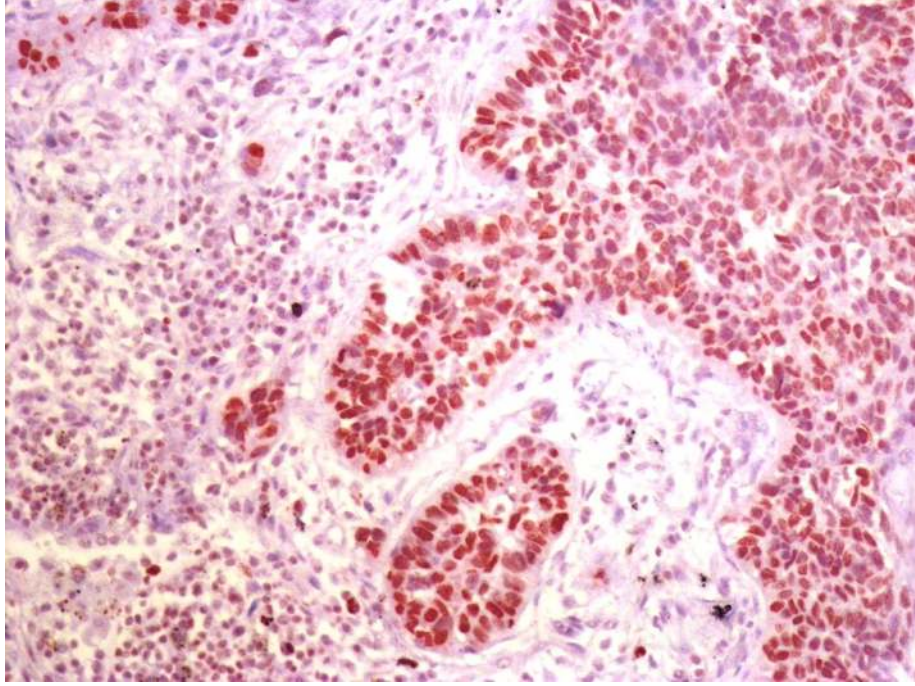
Resim 4. İhk ile Skor 1 SOX2 boyanması. (x100)



Resim 5. İhk ile Skor 2 SOX2 boyanması. (x100)



Resim 6. İhk ile Skor 3 SOX2 boyanması. (x100)



Resim 7. İhk boyanmasında pozitif kontrol olarak kullanılan akciğer skuamöz hücreli karsinomunda SOX2 ile (+) boyanma. (x100)